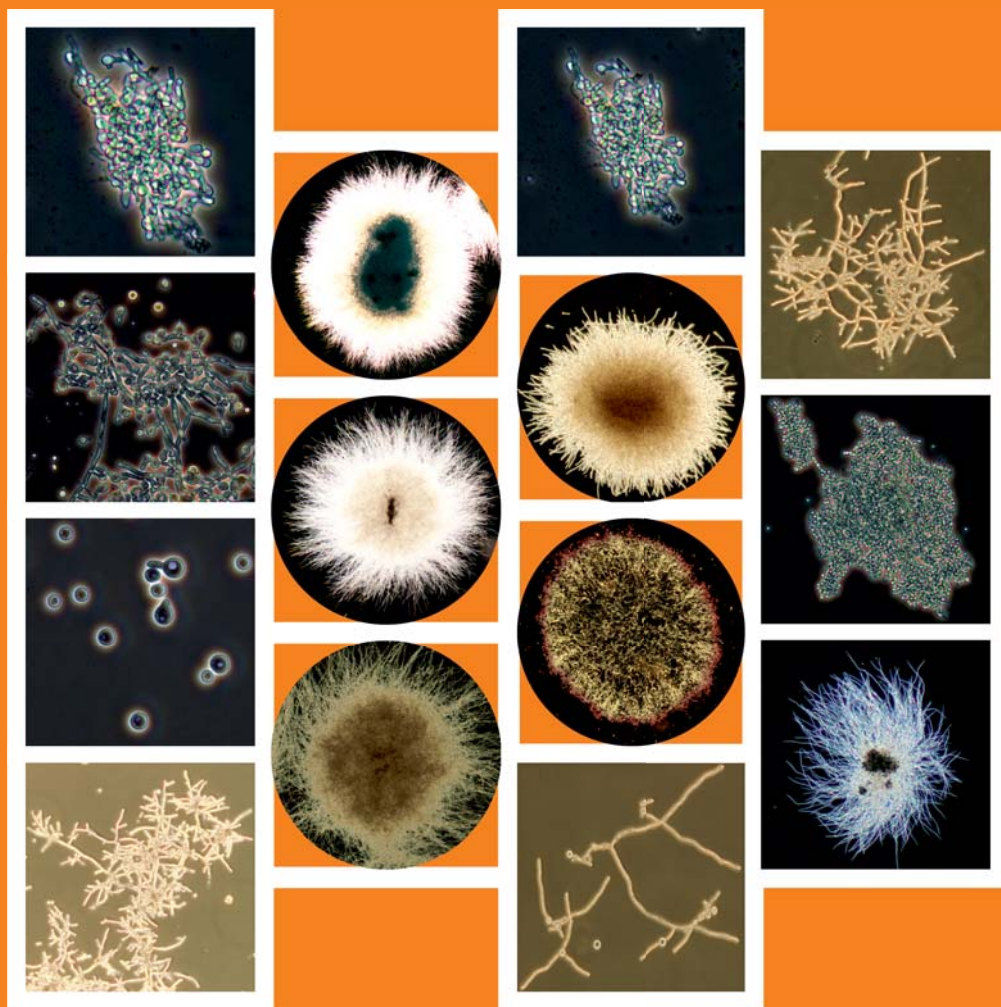


Marcin Bizukoć

WPROWADZENIE DO INŻYNIERII MORFOLOGICZNEJ MIKROORGANIZMÓW STRZĘPKOWYCH



Monografie
Politechniki Łódzkiej 2017

Marcin Bizukojć

**WPROWADZENIE DO INŻYNIERII MORFOLOGICZNEJ
MIKROORGANIZMÓW STRZĘPKOWYCH**

Monografie
Politechniki Łódzkiej 2017

Recenzenci:
prof. dr hab. Jerzy Długoński
prof. dr hab. inż. Krzysztof Warmuziński

Redaktor Naukowy Wydziału Inżynierii Procesowej
i Ochrony Środowiska
dr hab. Zofia Modrzejewska

© Copyright by Politechnika Łódzka 2017

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223
tel. 42-631-20-87, 42-631-29-52
fax 42-631-25-38
e-mail: zamowienia@info.p.lodz.pl
www.wydawnictwa.p.lodz.pl

ISBN 978-83-7283-784-4

Nakład 200 egz. Ark. druk. 8,0. Papier offset. 80 g, 70 x 100
Druk ukończono w kwietniu 2017 r.
Wykonano w Drukarni Quick-Druk, 90-562 Łódź, ul. Łąkowa 11
Nr 2188

Mojej córce Rozalii

Spis treści

1. Wprowadzenie	7
1.1. Krótka historia inżynierii morfologicznej	8
1.2. Cel i adresat monografii	9
2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych	11
2.1. Budowa i cykl życia promieniowców na przykładzie <i>Streptomyces</i> sp.	11
2.2. Budowa i cykl życia grzybów strzępkowych na przykładzie grzybów strzępkowych <i>Aspergillus</i> sp. i <i>Penicillium</i> sp.	14
2.2.1. Kielkowanie konidiospor	16
2.2.2. Wzrost strzępek	17
2.2.3. Tworzenie rozgałęzień	19
2.2.4. Sporulacja	20
2.3. Hodowla mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach	20
2.3.1. Morfologia mikroorganizmów strzępkowych w hodowli wglębnej	23
2.3.2. Mechanizm tworzenia aglomeratów przez mikroorganizmy strzępkowe w hodowlach wglębnych w bioreaktorach	25
2.4. Mierzalne parametry wykorzystywane dla form morfologicznych mikroorganizmów strzępkowych	31
3. Morfologia mikroorganizmów strzępkowych a wytwarzanie metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz enzymów	35
4. Wpływ morfologii mikroorganizmów strzępkowych na prowadzenie ich hodowli wglębnych w bioreaktorach	41
4.1. Reologia zawiesin mikroorganizmów strzępkowych	41
4.2. Mieszanie zawiesin mikroorganizmów strzępkowych	46
4.3. Napowietrzanie bioreaktorów: konwekcja i dyfuzja tlenu w bioreaktorze	52
5. Sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych	61
5.1. Tradycyjne metody sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych	63
5.1.1. Liczba spor w podłożu	63
5.1.2. Wpływ poziomu pH	66
5.1.3. Wpływ naprężeń mechanicznych na morfologię mikroorganizmów strzępkowych	67
5.1.4. Inne czynniki wpływające na morfologię grzybni i ich przydatność do tradycyjnego sterowania morfologią grzybni	73
5.2. Nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej	74
5.2.1. Mikroorganizmy strzępkowe a inżynieria morfologiczna	75
5.2.2. Hodowla z mikrocząstkami	78
5.2.2.1. Dobór mineralnych mikrocząstek dla maksymalizacji biosyntezy pożądaných metabolitów	78
5.2.2.2. Mechanizm działania mikrocząstek	84
5.2.2.3. Efekty oddziaływania mikrocząstek na mikroorganizmy strzępkowe	85
5.2.3. Inne nowoczesne techniki sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych	101

5.2.3.1. Dodatek substancji zmieniających lepkość i napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanych	101
5.2.3.2. Osmolalność podłoża a morfologia grzybni	104
5.2.3.3. Sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych przez modyfikacje genetyczne	109
6. Perspektywy rozwoju inżynierii morfologicznej	113
Literatura	115
Summary	123

1. Wprowadzenie

Wykorzystanie w biotechnologii mikroorganizmów strzępkowych, do których zalicza się prokariotyczne promieniowce oraz eukariotyczne grzyby strzępkowe, trwa już od wielu dekad. Te mikroorganizmy są źródłem wartościowych metabolitów pierwotnych (kwasów organicznych), wtórnych (antybiotyków, chemioterapeutyków i innych substancji używanych w medycynie) oraz enzymów, przede wszystkim enzymów hydrolitycznych. Na skalę przemysłową mikroorganizmy strzępkowe hodowane są najczęściej w zawieszynie (hodowla wgłębna). Po wielokroć opisywano w literaturze dobór optymalnych warunków procesowych dla hodowli tych mikroorganizmów, optymalizowano składy podłoża lub modyfikowano genetycznie szczepy produkcyjne. Prace te były prowadzone zarówno przez mikrobiologów, jak i inżynierów.

W czasie tych badań tylko w ograniczonym stopniu uwzględniano istotny czynnik leżący na granicy mikrobiologii i inżynierii biochemicznej, a mianowicie formę morfologiczną promieniowców i grzybów strzępkowych w danej hodowli. W naukach biologicznych mianem morfologii organizmu określa się jego kształt zewnętrzny wynikający przede wszystkim z faktu przynależności do konkretnej grupy systematycznej organizmów. Jednakże warunki wzrostu również oddziałują na tworzenie konkretnej formy morfologicznej. Morfologia mikroorganizmów w procesach bioreaktorowych nie ma praktycznie znaczenia, jeżeli ma się do czynienia z takimi organizmami jednokomórkowymi, jak bakterie i drożdże (te ostatnie są także grzybami). Jednak w przypadku kolonijnych promieniowców tworzących coś w rodzaju strzępek oraz wielokomórkowych grzybów strzępkowych ze względu na różnicowanie się komórek tychże mikroorganizmów oraz odmienny sposób ich wzrostu w porównaniu do mikroorganizmów jednokomórkowych morfologia odgrywa znaczącą rolę. Co więcej, zgromadzono dowody, że sposób wzrostu mikroorganizmu strzępkowego może się łączyć z jego zdolnością do biosyntezy wybranych metabolitów. W niektórych przypadkach udało się powiązać tworzenie konkretnej formy morfologicznej mikroorganizmu z wydajnością produkcji metabolitów, w innych pozostaje to nierozstrzygnięte.

Co więcej, konkretna forma morfologiczna mikroorganizmów strzępkowych występująca w bioreaktorze niesie ze sobą konsekwencje techniczne. Zagadnienie napowietrzania hodowli wgłębnej, w tym konwekcja tlenu do podłoża i jego dyfuzji do komórek mikroorganizmów czy też mieszanie zawiesiny o zmiennych właściwościach reologicznych (wysoka lepkość niutounowska czy właściwości nieniuounowskie) są wyzwaniem dla inżynierii biochemicznej.

Ponieważ istotą działania każdego inżyniera jest jak najpełniejsza kontrola nad prowadzonym procesem, stąd przypadkowe zmiany właściwości zawiesin mikroorganizmów strzępkowych powodowane zmianami ich morfologii, pozostają dość znaczącym problemem.

Z potrzeby sterowania formą morfologiczną promieniowców i grzybów strzępkowych w hodowlach wgłębnych narodziła się na początku XXI wieku gałąź nauki, czy też technika, chyba jeszcze trochę za wcześnie to rozstrzygać, zwana inżynierią morfologiczną (ang. *morphological/morphology engineering*),

która stawia sobie za cel jak najbardziej zaawansowaną kontrolę i sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych hodowanych w bioreaktorach w celu maksymalizacji wytwarzanych przez nie metabolitów. I właśnie inżynierii morfologicznej, temu czym ona jest oraz korzyściom wynikającym z wykorzystywania jej technik, będzie poświęcona ta monografia. Jest to pierwsze takie opracowanie w Polsce.

1.1. Krótka historia inżynierii morfologicznej

Pisząc o inżynierii morfologicznej i używając w tytule słowa „krótka”, nie należy tego słowa interpretować jako skrócona, ponieważ minęło dopiero około 15 lat od pojawienia się tego pojęcia w literaturze naukowej z dziedziny inżynierii biochemicznej i pierwszych badań na ten temat.

W 2001 roku w cenionej serii monograficznej z dziedziny inżynierii biochemicznej i biotechnologii *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* wydawanej przez wydawnictwo Springer ukazał się artykuł zatytułowany: *Metabolic engineering of the morphology of Aspergillus* autorstwa Mhairi’ego McIntyre’a, Christiana Müllera, Jensa Dynesena oraz Jensa Nielsena z Politechniki Duńskiej w Lyngby. Artykuł ten nie traktował bezpośrednio o inżynierii morfologicznej, ale wyrażenie *morphological engineering* pojawiło się jako słowo kluczowe. Pojawiło się także w nim znaczące zdanie, które zostanie tu zacytowane w oryginale:

...when **considering tailoring morphologies for specific bioprocesses, here referred to as morphological engineering**, it is not known which genes, either structural or regulatory, would be of interest.

Autorzy rozumieli inżynierię morfologiczną jako technikę sterowania morfologią w procesach z udziałem grzybów strzępkowych i doszukiwali się sposobu zmiany tejże morfologii poprzez modyfikowanie genów za nią odpowiedzialnych u grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus* (McIntyre *et al.*, 2001).

Co więcej, używając tego wyrażenia McIntyre *et al.* (2001), odnosili się do klasycznych publikacji traktujących o wpływie morfologii na biosyntezę metabolitów (zwykle na przykładzie *Penicillium chrysogenum* i penicyliny), ale jednocześnie potraktowali oni inżynierię morfologiczną jako nową koncepcję wymagającą rozwinięcia.

Już w 2002 roku ten sam zespół tym razem z Christianem Müllerem jako pierwszym autorem zaproponował modyfikację genetyczną *Aspergillus oryzae* polegającą na uszkodzeniu genów syntaz chitynowych w celu zmiany morfologii grzywni (Müller *et al.*, 2002a). Później koncepcja inżynierii morfologicznej została rozwinięta na Uniwersytecie w Dublinie (Irlandia). W roku 2005 Cormac O’Cleirigh obronił pracę doktorską na temat: *Quantification and regulation of pellet morphology in Streptomyces hygroscopicus var. geldanus cultures*, w której po raz pierwszy wykazał możliwości wpływania na morfologię promieniowców poprzez manipulację lepkością i napięciem powierzchniowym

podłoża hodowlanego (O’Cleirigh, 2005). O’Cleirigh wraz ze współpracownikami opublikowali dwie oryginalne prace na ten temat (O’Cleirigh *et al.*, 2005, Dobson *et al.*, 2008).

W 2006 roku Gilles van Wezel wraz ze współpracownikami w Politechnice w Delft (Holandia) zastosowali manipulacje genetyczne, a dokładnie wzmocnienie działania genu SsgA odpowiedzialnego za biosyntezę peptydoglikanu, składnika ścian komórkowych, w celu zmiany morfologii kilku gatunków promieniowców z rodzaju *Streptomyces* (van Wezel *et al.*, 2006).

W 2008 roku Bjorn-Arne Kaup i współpracownicy z Karl-Winnacker-Institut we Frankfurcie nad Menem (Niemcy) pierwszy raz zmierzili się z kilkoma grzybami strzępkowymi, w tym z *Caldariomyces fumago*, proponując dodatek mikrocząstek mineralnych do podłoża hodowlanych. Stało to się później nową techniką inżynierii morfologicznej nazwaną *microparticle-enhanced cultivation* (MPEC). I właśnie u *Caldariomyces fumago* uzyskali zwiłokrotnienie wydajności wytwarzania chloroperoksydazy. Ciekawostką jest to, że w tym artykule jednak nie padło określenie inżynieria morfologiczna (Kaup *et al.*, 2008). Od roku 2009 zespół Christopha Wittmanna, a następnie Rainera Krulla z Politechniki w Brunzshwiku (Niemcy), zajął się stosowaniem takich technik inżynierii morfologicznej*, jak MPEC oraz zwiększania osmolalności podłoża, wobec różnych szczepów *Aspergillus niger* wytwarzających α -glukoamylazę i β -fruktofuranozydazę, publikując około 10 artykułów naukowych na ten temat. Od 2012 badania nad zastosowaniem MPEC wobec producenta lowastatyny *Aspergillus terreus* oraz grzybów białej zgnilizny należących do klasy *Basidiomycetes* *Cerrena unicolor* i *Pleurotus sapidus* są prowadzone w Politechnice Łódzkiej pod kierunkiem autora tej monografii.

W ostatnich latach (2015-2016) pojawiły się także publikacje tureckich naukowców (Uniwersytet w Antalyi, Turcja oraz Uniwersytet Stanowy Pensylwanii, USA) dotyczące zastosowania MPEC wobec grzybów z rodzaju *Rhizopus* i *Aspergillus*. Zaś chiński zespół z uniwersytetu stanowego stanu Waszyngton (USA) zajął się użyciem mikrocząstek mineralnych wobec grzyba *Mortierella isabellina* produkującego lipidy.

1.2. Cel i adresat monografii

Celem niniejszej monografii jest wprowadzenie czytelników w zagadnienia inżynierii morfologicznej mikroorganizmów strzępkowych. Aby ułatwić zrozumienie tych zagadnień, w pierwszych rozdziałach zostały zwięźle przedstawione podstawowe informacje na temat wzrostu i rozwoju promieniowców oraz grzybów strzępkowych wraz z tworzeniem przez nie różnych form morfologicznych. Dodatkowo przedstawiono wybrane zagadnienia inżynierii biochemicznej (mieszanie, napowietrzanie, ruch masy) dotyczące, w szczególności hodowli

* Ci autorzy w języku angielskim używają pojęcia *morphology engineering* zamiast pierwotnego *morphological engineering*. W innych publikacjach te wyrażenia też bywają stosowane zamiennie.

mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach. Opracowanie to również w dużej części zostało poświęcone konkretnym przykładom zastosowań technik inżynierii morfologicznej w celu sterowania morfologią grzybni.

Niniejsze opracowanie ma charakter pionierski, gdyż zagadnienia inżynierii morfologicznej mikroorganizmów strzępkowych nie zostały jeszcze ujęte, wedle wiedzy autora, w ramy żadnego podręcznika czy monografii w języku angielskim. Istnieją jedynie artykuły przeglądowe na ten temat. W języku polskim jest to oczywiście pierwsze takie opracowanie.

Adresatem monografii są naukowcy, w tym doktoranci, zajmujący się hodowlą mikroorganizmów strzępkowych. Również mogą z niego korzystać studenci studiów magisterskich. Niewykluczone jest również to, że inżynierowie pracujący w przemyśle biotechnologicznym znajdą w tej lekturze pewne inspiracje.

2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych

Promieniowce (*Actinobacterium*) należą do nadkrólestwa *Prokaryota*, a dokładniej są bakteriami gramdodatnimi, tworzącymi charakterystyczne kolonijne struktury. Poprzez podobieństwo morfologiczne do grzybów strzępkowych promieniowce były przez wiele lat z nimi mylone i nadal w biotechnologii są technicznie traktowane wraz z grzybami strzępkowymi jako jedna grupa mikroorganizmów strzępkowych. Grzyby (*Mycota*) zaś są organizmami wielokomórkowymi należącymi od nadkrólestwa *Eukaryota*. Za grzyby strzępkowe w biotechnologii i inżynierii biochemicznej uznajemy tę część królestwa grzybów *Mycota*, które rosną w postaci strzępek, czyli wydłużonych nitkowych wielokomórkowych struktur. Wyłączone są z tej grupy nietworzące strzępek drożdże (niektórzy przedstawiciele klasy *Ascomycetes*). Do grzybów strzępkowych należą przede wszystkim przedstawiciele grzybów właściwych *Eumycota*, klasy *Zygomycetes* (sprzężniaki) oraz *Ascomycetes* (workowce). Chociaż z racji kapeluszowych owocników oraz braku tworzenia bezpłciowych spor stojące ewolucyjnie najwyżej grzyby klasy *Basidiomycetes* czasami nie określa się mianem grzybów strzępkowych, to tak naprawdę tworzą one strzępki podziemne. Wobec nich także zastosowano techniki inżynierii morfologicznej. Zarówno promieniowce, jak i grzyby strzępkowe są organizmami tlenowymi, a zainteresowanie nimi w biotechnologii wynika głównie z ich bogatego metabolizmu wtórnego. O tych metabolitach będzie mowa w podrozdziale 3.1. Głównym miejscem bytowania mikroorganizmów strzępkowych na Ziemi jest gleba, chociaż istnieją gatunki żyjące zarówno w wodach słodkich, jak i słonych.

Zastanówmy się jeszcze, co łączy z technologicznego punktu widzenia promieniowce i grzyby strzępkowe. Otóż w ciekłych hodowlach wgłębnych jedne i drugie rosną w postaci strzępek, form typu *clump* i peletek (*vide*: rozdz. 2.3). Sprawia to, że opis matematyczny ich wzrostu oraz bioreaktora, w którym prowadzona jest hodowla, jest taki sam. Chociaż nie zawsze da się znaleźć jednoznaczłą korelację między wytwarzaniem metabolitów pierwotnych, wtórnych i enzymów a morfologią promieniowców i grzybów (*vide*: rozdz. 3.1), to i tak złożona morfologia tych mikroorganizmów jest uważana za jeden z najsilniejszych czynników oddziałujących zarówno pozytywnie, jak i negatywnie na przebieg takiego procesu bioreaktorowego (*vide*: rozdz. 4).

2.1. Budowa i cykl życia promieniowców na przykładzie *Streptomyces* sp.

Promieniowce są mikroorganizmami o prokariotycznej budowie komórki. Posiadają nukleoid zamiast jądra komórkowego, a ich rybosomy co do wielkości są takie same, jak te należące do zwykłych bakterii. Są blisko spokrewnione

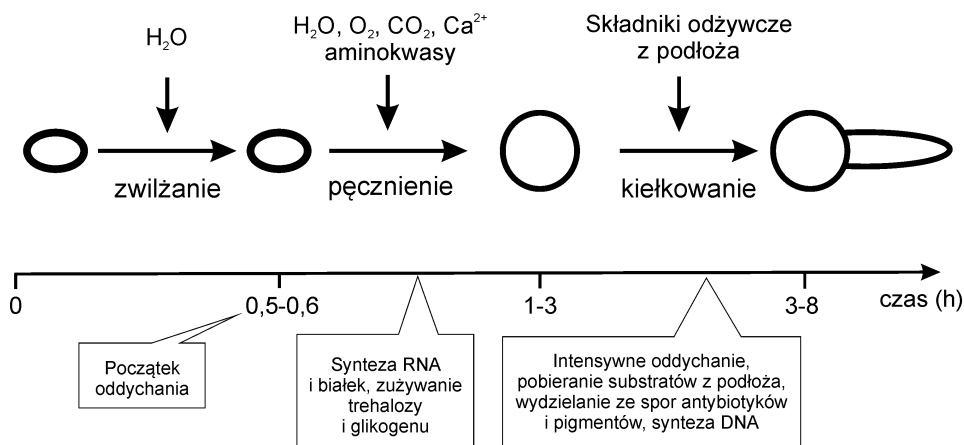
z bakteriami między innymi z rodzaju *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* i *Cellulomonas* i nie mają filogenetycznie nic wspólnego z grzybami strzępkowymi. Do promieniowców tradycyjnie zaliczamy następujące rodzaje tlenowych bakterii gramdodatnich: *Thermoactinomyces*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Streptomyces* i *Nocardia*. Cechą charakterystyczną promieniowców jest tworzenie „grzybni”^{*} w postaci „strzępek”. Również rozmnażanie się promieniowców nie przypomina typowego podziału komórek bakterii. Wytwarzają one egzospory poprzez fragmentację „grzybni”, co przypomina nieco artrospory występujące u grzybów niższych z klasy *Zygomycetes*. I tę właśnie nazwę spor najczęściej stosuje się dla promieniowców. Wyjątkiem są promieniowce z rodzaju *Thermoactinomyces*, wytwarzające termooporne endospory podobne do tych u *Bacillus* czy *Clostridium*. Ze względu na bogaty metabolizm wtórny oraz wytwarzanie szerokiej gamy antybiotyków promieniowce z rodzaju *Streptomyces* odgrywają największą rolę w przemyśle, są szeroko badane i stosuje się wobec nich techniki inżynierii morfologicznej. Stąd w niniejszej monografii będą reprezentatywną grupą promieniowców.

Wzrost „strzępek” u promieniowców z rodzaju *Streptomyces* przebiega następująco. Artrospory *Streptomyces* mają różną zdolność do kiełkowania zależnie od ich wieku. Najlepiej kiełkują spory 2-4 tygodniowe. Do kiełkowania artrospor niezbędne jest uwodnienie środowiska. Zwilżenie spor prowadzi do modyfikacji ich powierzchni, co umożliwia zarówno wnikanie wody, jak i transport różnych substancji zarówno do wewnątrz spory, jak i ze spory na zewnątrz. Proces zwilżania spor zależy od obecności jonów wapnia, magnezu lub żelaza w podłożu. Obecność niskocząsteczkowych związków stymulujących kiełkowanie przyspiesza ten proces. Należą do nich niektóre aminokwasy, jak L-alanina, kwas L-glutaminowy, L-tyrozyna, zasady purynowe, kwas p-aminobenzoowy oraz dwutlenek węgla. Ciekawą cechą spor promieniowców jest obecność w nich metabolitów wtórnych o cechach antybiotycznych, które mogą hamować ich kiełkowanie. Zaobserwowano to zjawisko u *Streptomyces viridichromogenes*, który wytwarza streptazolinę, będącą substancją bakterio- i grzybobójczą. Wydzielenie substancji antybiotycznej na zewnątrz jest prawdopodobnie warunkiem uruchomienia procesu kiełkowania spor.

Kiedy spora pęcznieje, uruchamianie są procesy kataboliczne, a jako źródło węgla są wykorzystywane trehaloza i glikogen. Rozpoczyna się również synteza RNA i białek. Pierwsza replikacja DNA jest uruchamiana w momencie wyrastania kiełka. Najczęściej od wprowadzenia wody do pojawienia się kiełka mija od 3 do 8 godzin (rys. 2.1).

^{*} Ponieważ u promieniowców z biologicznego punktu widzenia nie występuje prawdziwa strzęпка czy grzybnia, a technicznie łatwiej jest używać tych pojęć, to w kontekście tych mikroorganizmów będzie stosowany cudzołósł.

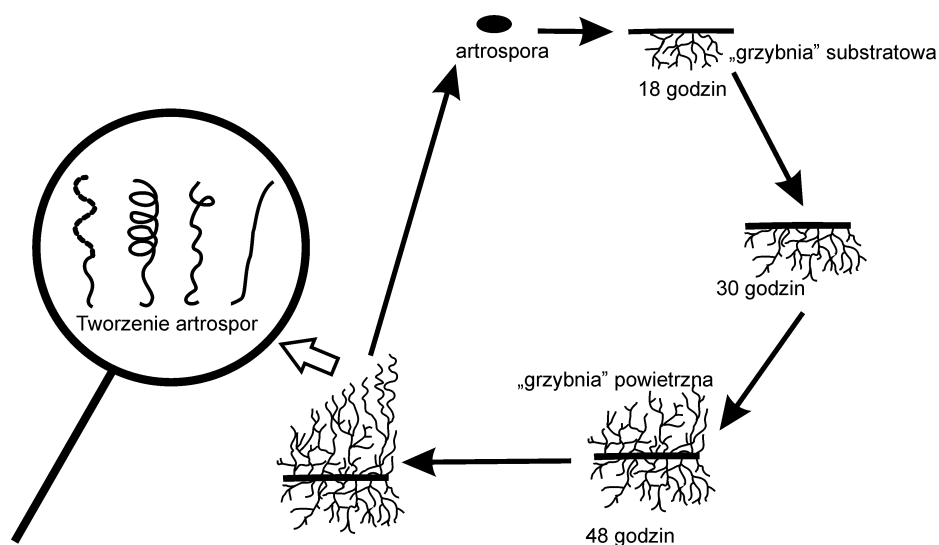
2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych



Rys. 2.1. Początkowe stadia wzrostu promieniowców z rodzaju *Streptomyces*

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Chmiel (1998).

Pojedynczy kiełek („strzępka” wegetatywna) wylania się z kiełkującej spory, a następnie się wydłuża. Za wydłużanie się „strzępek” odpowiadają komórki zlokalizowane na ich wierzchołkach i szacuje się, że te obszary mają długość około 20 μm . W tym obszarze nie ma rozgałęzień. Jednak następujący co jakiś czas podział komórek, prowadzi do rozgałęziania „strzępek”. W efekcie powstaje spleciona struktura „strzępek”, która wraść w podłoże i jest ona nazywana „grzybnią” substratową lub wegetatywną (rys. 2.2).



Rys. 2.2. Cykl życia promieniowców (wzrost na podłożu stałym) z rodzaju *Streptomyces*

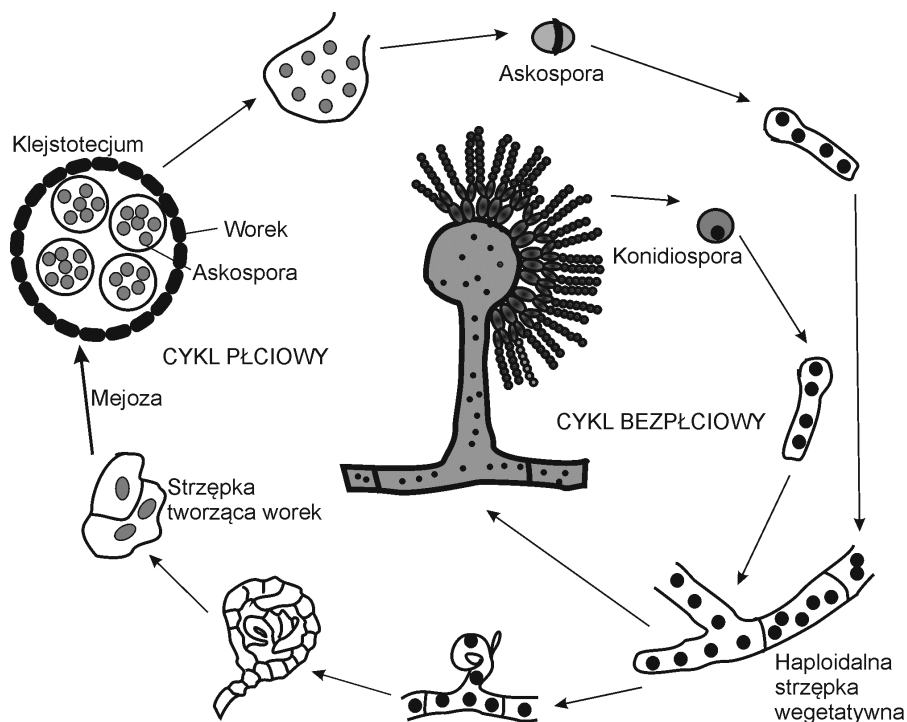
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Angert (2005).

Pojawianie się sept (przegród) między komórkami nie jest zbyt częste, przeważnie tworzą się długie komórki zawierające większą liczbę nukleoidów. Kiedy następuje wyczerpanie składników odżywczych, włącza się biochemiczna kaskada sygnałów w celu wyprodukowania surfaktanta pokrywającego komórki. Ten surfaktant pozwala na wzrost strzępek bez dostępu do substratu. Tworzy się w ten sposób „grzybnia” powietrzna zwana też „grzybnią” generatywną. Nierozgałęzione „strzępki” „grzybni” powietrznej ulegają różnicowaniu. Dzielią się szybko, tworząc komórki, z których każda zawiera pojedynczy nukleoid. Te komórki przekształcają się ostatecznie w artrospory. Zależnie od gatunku promieniowca forma morfologiczna „grzybni” generatywnej może być różna, np. rozgałęziona lub w postaci skręconych śrub. Jedna „strzępka” generatywna wytwarza dużą liczbę artrospor. Artrospory *Streptomyces* pod względem struktury różnią się od komórek wegetatywnych. Mają bardziej zagęszczoną cytoplazmę oraz grubszą ścianę komórkową zawierającą barwnik i pojedynczy nukleoid (Chmiel, 1998; Angert, 2005).

2.2. Budowa i cykl życia grzybów strzępkowych na przykładzie grzybów strzępkowych *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp.

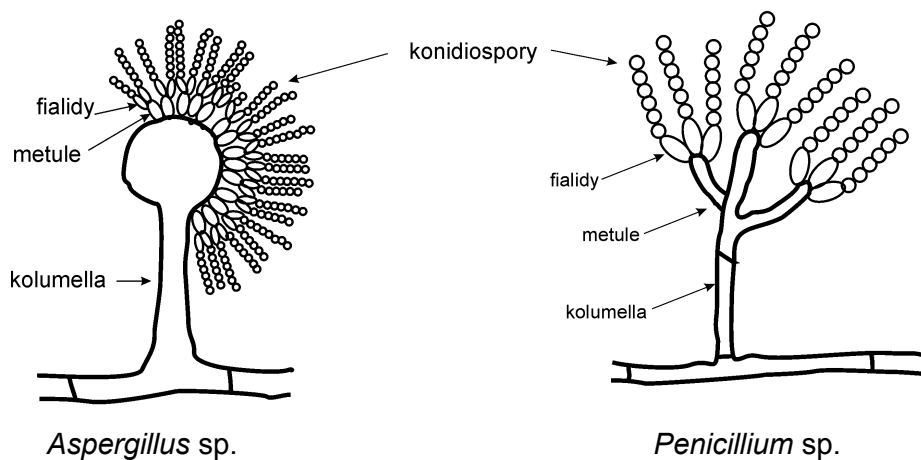
Wzrost grzybów strzępkowych to proces wieloetapowy i charakteryzuje się silnym różnicowaniem się morfologicznym mikroorganizmu. Poniższy opis dotyczy grzybów strzępkowych z klasy workowców (*Ascomycetes*) z tego względu, że te mikroorganizmy zostały najdokładniej opisane w literaturze. Wynika to z tego, że należące między innymi do workowców grzyby strzępkowe z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* są najczęściej wykorzystywane w biotechnologii ze względu na bogaty metabolizm i użyteczność ich metabolitów dla człowieka (*vide*: rozdz. 3).

Na rys. 2.3 został przedstawiony cykl życia grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*. Cykl życiowy grzybów strzępkowych, jak *Aspergillus* sp. zaczyna się od kiełkowania haploidalnych spor bezpłciowych (konidiospor) i wzrostu grzybni wegetatywnej w postaci strzępek podzielonych zwykle septami. U grzybów niższych (np. *Zygomycetes*) sept nie ma i mamy do czynienia z komórkami wielojądrowymi zwanymi komórczakami. Następnie wytworzony zostaje aparat konidionośny charakterystyczny dla danego grzyba strzępkowego. Jest on swego rodzaju wizytówką, wskazującą, do jakiego rodzaju należy grzyb strzępkowy (rys. 2.4). Na aparacie konidionośnym powstają bezpłciowe spory.



Rys. 2.3. Cykl życia *Ascomycetes* na przykładzie *Aspergillus* sp.

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Casselton i Zolan (2002).



Rys. 2.4. Układ konidialny grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Grzyby z klasy *Ascomycetes* wytwarzają także klejstotecja (worki, forma owocnika), w których znajdują się spory płciowe zwane askosporami (rys. 2.3). Mówiąc o rozmnażaniu płciowym grzybów, należy pamiętać, że grzybnia wegetatywna jest prawie zawsze haploidalna (wyjątkiem u workowców są niektóre drożdże). Spory płciowe powstają w wyniku trójetapowego procesu, na który składają się plazmogamia (połączenie się strzępek o różnej „płci”), kariogamia (połączenie się haploidalnych jąder tych strzępek i powstanie diploidalnego jądra komórkowego) oraz podział mejotyczny (redukcyjny) jądra komórkowego, w wyniku którego powstają cztery haploidalne askospory. Rozmnażanie płciowe grzybów strzępkowych nie ma większego znaczenia w biotechnologii, gdyż w warunkach hodowli przemysłowych nie dochodzi do procesu płciowego. Co więcej, uśpienie askospor ma charakter konstytutywny. Oznacza to, że ich wykiełkowanie wymaga szeregu takich bodźców, jak wysoka lub niska temperatura, energia świetlna czy obecność określonych substancji chemicznych. Takie spory, w przeciwieństwie do spor bezpłciowych, zwykle nie kiełkują po umieszczeniu ich w podłożu hodowlanym. Te grzyby z klasy *Ascomycetes*, u których nie zaobserwowano tworzenia bezpłciowych spor zaliczamy do specjalnie stworzonej klasy grzybów niedoskonałych (*Deuteromycetes*).

Z punktu widzenia przemysłowej hodowli grzybów strzępkowych ich pełny cykl życia nie jest aż tak istotny, natomiast etapy wzrostu strzępek wegetatywnych są znacznie ważniejsze, gdyż to one mają bezpośredni wpływ na morfologię grzybni. Te etapy to: (1) kiełkowanie konidiospor, (2) wydłużanie się kielków i tworzenie strzępek, (3) rozgałęzianie się strzępek oraz (4) wytwarzanie narządów (konidiofor) do tworzenia konidiospor (sporulacja). Poniżej zostaną szczegółowo omówione.

2.2.1. Kielkowanie konidiospor

Konidiospora jest stadium spoczynkowym grzyba strzępkowego. W konidiosporze nie zachodzą żadne reakcje syntezy materiału komórkowego. Metabolizm jest bardzo wolny, zawartość wody jest niewielka i nie obserwuje się ruchów cytoplazmy. Do uruchomienia procesu kiełkowania spor konieczna jest obecność w podłożu związków niskocząsteczkowych, które są cząsteczkami sygnałowymi dla uśpionych spor. Należą do nich sacharydy (źródło węgla), aminokwasy (źródło azotu) czy sole mineralne. Na przykład w przypadku *Neurospora crassa* obecność źródła węgla i mikroelementów jest wystarczająca do uruchomienia procesu kiełkowania spor, zaś *Aspergillus nidulans* potrzebuje jedynie glukozy (Osharov i May, 2001). Co ciekawe przez około 14-16 godzin od wprowadzenia konidiospor *Aspergillus niger* do podłoża inokulacyjnego zawierającego glukozę, fruktozę, jony amonowe oraz inne składniki mineralne, nie obserwuje się pobierania źródła węgla, choć po tym czasie dawno faza kiełkowania spor się kończy i zaczyna się faza rozgałęziania strzępek (Bizukojć i Ledakowicz, 2006). Jednak bez obecności źródła węgla u *Aspergillus* sp. do kiełkowania konidiospor w ogóle nie dochodzi. Co więcej, pomimo tego, że grzyby strzępkowe są organizmami tlenowymi, w pierwszych godzinach kiełkowania spor zapotrzebowanie na tlen jest minimalne i jeżeli spory kiełkują

w podłożu ciekłym, ciągłe napowietrzanie podłoża jest właściwie niepotrzebne (Grimm *et al.*, 2005). Należy jeszcze pamiętać, że warunki sprzyjające kiełkowaniu spor różnią się od tych, które są optymalne dla dalszego wzrostu vegetatywnego grzybni. Z tego względu skład podłoża wykorzystywanego jako prekultura jest często odmienny od podłoża hodowlanych (produkcyjnych).

Kiełkowanie konidiospor przebiega w trzech fazach. Rozpoczyna się od pęcznienia konidiospory, następnie wysuwa się kiełek. Trzecią fazą jest wydłużanie się kielka (Paul *et al.*, 1992). Niektórzy autorzy dzielą jeszcze proces pęcznienia spor na endogenny i egzogeny (Ynagita, 1957). Podczas pęcznienia endogennego następuje głównie wchłanianie wody i ten etap jest niezależny od warunków środowiska. Pęcznienie egzogenne jest natomiast zależne od składu podłoża inokulacyjnego i obecności w nim wyżej wspomnianych cząsteczek sygnałowych.

Na etapie kiełkowania spor uruchamiane są procesy syntezy komórkowej. Rośnie liczba mitochondriów i zwiększa się rozmiar retikulum endoplazmatycznego, na którym zlokalizowane są rybosomy. Organelle te są odpowiedzialne za syntezę białek w komórce. Zaobserwowano również dużą aktywność szlaku pentozofosforanowego u kiełkujących spor *Penicillium chrysogenum* (Kornfeld i Knight, 1962). Często również są uruchamiane szlaki anaplerotyczne, czyli bezpośredniego wiązania dwutlenku węgla do fosfoenolopirogronianu i pirogronianu, co sprawia, że proces kiełkowania spor niektórych grzybów jest wrażliwy na stężenie dwutlenku węgla w otoczeniu (Nielsen, 1997).

Po pewnym czasie zależnym od gatunku grzyba strzępkowego spora traci swój okrągły kształt i pojawia się kiełek. Uznaje się, że jeżeli kolistość konidiospory definiowana jako:

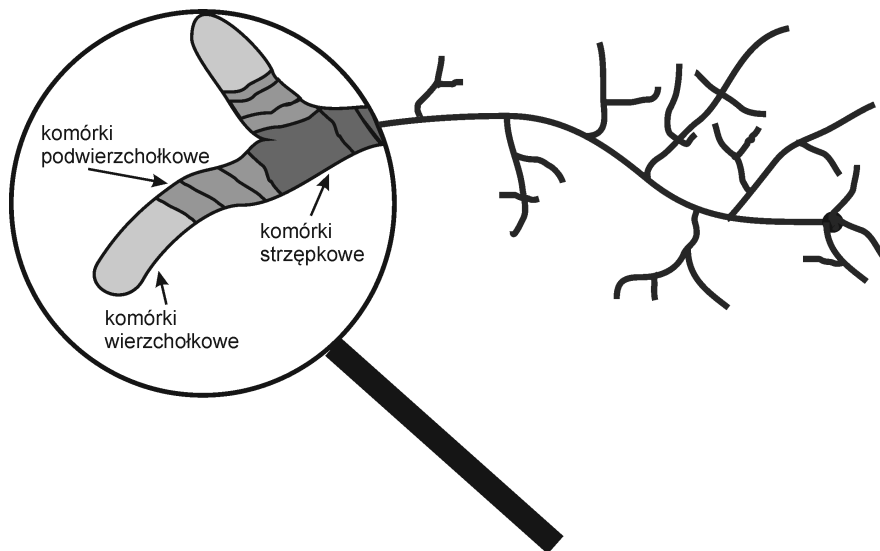
$$C = \frac{P}{2\sqrt{\pi \cdot A}} \quad (2.1)$$

gdzie: P jest obwodem spory (μm), zaś A to pole powierzchni rzutu spory (μm^2) i jeśli przekroczy 1,2, to można ją uznać za wykiełkowaną (Paul *et al.*, 1993). Liczba kielków, jaka może wyrosnąć z jednej spory, zależy od gatunku mikroorganizmu. Na przykład u *Penicillium megasporium* obserwowano od jednego do trzech kielków (Fletcher, 1969) zaś u *Aspergillus niger* (producent kwasu cytrynowego) dwa kielki (Bizukojć i Ledakowicz, 2006).

2.2.2. Wzrost strzępek

Wydłużanie się strzępek vegetatywnych, a zatem ich wzrost, odbywa się wyłącznie na wierzchołkach. Kilka komórek wierzchołkowych bierze udział we wzroście strzępki, dostarczając odpowiednią ilość cytoplazmy i prekursorów do budowy ściany komórkowej. Te komórki wierzchołkowe nie są oddzielone od siebie septami, ale każda z nich posiada wyraźnie umiejscowione własne jądro komórkowe. Tę część strzępki nazywa się obszarem wierzchołkowym (*apical cells*). Tuż za nim znajdują się oddzielone septą komórki podwierzchołkowe

(*subapical cells*). Septa oddzielająca komórki wierzchołkowe od podwierzchołkowych jest perforowana i dlatego między nimi następuje wymiana protoplazmy. Wakuole w miarę oddalania się od wierzchołka strzępki są coraz większe, a jedną z ich funkcji jest stworzenie odpowiedniego ciśnienia wewnątrzkomórkowego, żeby umożliwić transport protoplazmy do wierzchołka (Nielsen, 1992). Dalszy obszar określa się jako komórki strzępkowe (*hyphal cells*). Na rys. 2.5 przedstawiono schematycznie różnicowanie się strzępek grzybni.



Rys. 2.5. Rozgałęziona strzępka. Powiększony fragment pokazuje podział strzępki na przedziały wierzchołkowy, podwierzchołkowy oraz strzępkowy. Na przedziale podwierzchołkowym zaznaczone zostały septy

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Ze względu na naturę wzrostu grzybów nitkowych nie istnieje pojęcie cyklu komórki, tak jak jest to w przypadku organizmów jednokomórkowych (bakterie i drożdże) rozmnażających się przez podział. Z tego powodu wprowadzono pojęcia cyklu podwojenia, składającego się z czterech etapów: (1) liniowego wzrostu długości nowo uformowanego wierzchołka, (2) wzrostu objętości cytoplazmy przypadającej na jądro, aż do osiągnięcia krytycznej wartości, przy której następuje podział jądra, (3) wykładniczej syntezy nowych jąder komórkowych aż do podwojenia ich liczby, (4) uformowania nowego przedziału wierzchołkowego, gdy objętość poprzedniego podwoi się i powstanie dzieląca je septa. Ten opis dokładnie odzwierciedla mechanizm wzrostu komórek grzybów strzępkowych, co ilościowo udowodniono, mierząc czas podwojenia ilości biomasy i czas wyżej opisanego cyklu duplikacji. Okazały się one identyczne dla *Aspergillus nidulans* (Fiddy i Trinci, 1976).

W obrębie komórek wierzchołkowych znajduje się duża liczba drobnych pęcherzyków-wodniczek, które w odróżnieniu od prawdziwych wakuol (*vacuoles*) nazwano w języku angielskim *vesicles* (Trinci i Collinge, 1975). Zaproponowano następujące wyjaśnienie znaczenia obecności tych pęcherzyków w komórkach wierzchołkowych. Pęcherzyki te niosą w sobie przede wszystkim enzymy lityczne (chitynazy), prekursory do syntezy ścian komórkowych oraz enzymy syntetyzujące. Aby strzępka grzybni uległa wydłużeniu, musi najpierw ulec hydrolizie gruba i sztywna chitynowa ściana komórkowa, bo tylko wtedy może się zwiększyć ilość cytoplazmy i innych składników komórkowych. Po wydłużeniu ściana komórkowa musi zostać odbudowana. Pęcherzyki te powstają w wyspecjalizowanych obszarach strefy wierzchołkowej i podwierzchołkowej. Następnie są transportowane do samego wierzchołka. Tam po zetknięciu się ze ścianą komórkową wydzielają swoją zawartość. Enzymy lityczne osłabiają konstrukcję ściany komórkowej, która przez to ulega ciśnieniu cytoplazmy i rozszerza się, powodując wydłużenie się strzępki. Następnie enzymy syntetyzujące umacniają rozszerzoną strzępkę bez utraty przez ścianę komórkową pierwotnych własności (Bartnicki-Garcia, 1973).

Bartnicki-Garcia (1990) opracował także teorię opisującą mechanizm transportu pęcherzyków. Jest to tzw. teoria VSC (*Vesicle Supply Center*) i przeprowadził symulację numeryczną transportu pęcherzyków. Według tej teorii VSC nie jest miejscem syntezy pęcherzyków, lecz punktem ich gromadzenia, od którego zaczynają migrację do wierzchołków strzępek. Model ten zakłada również stałą szybkość dostarczenia pęcherzyków we wszystkich kierunkach. Obliczenie położenia VSC w strzępce ma duże znaczenie fizjologiczne. Jeśli uzupełni się tego typu model o opis procesu rozgałęziania, to otrzymane zostanie narzędzie do sprawdzania różnych hipotez na temat mechanizmu wzrostu grzybów nitkowych. Jednakże model ten ma pewną wadę. Nie może być użyty do opisu całej kultury grzybów nitkowych, gdyż nie bierze pod uwagę wpływu środowiska oraz nie opisuje mechanizmów przemieszczania się VSC (Nielsen, 1992).

2.2.3. Tworzenie rozgałęzień

Wydłużanie strzępek grzybni nie może trwać w nieskończoność. Nie byłoby możliwe dostarczenie wszystkich substancji niezbędnych do wzrostu wierzchołka na większą odległość. Z tego powodu w pewnym momencie rozwoju grzybni zaczyna się rozgałęziać (*branching*). Istnieją pewne preferowane punkty tworzenia się rozgałęzień na strzępce. Tymi punktami są miejsca, gdzie z różnych przyczyn następuje nagromadzenie pęcherzyków (*vesicles*) (Trinci, 1978). Ponieważ są one wytwarzane ze stałą prędkością, to w miejscu gdzie przepływ cytoplazmy jest zmniejszony, czyli wokół perforowanych sept nastąpi ich akumulacja. Pozwala to na wyciągnięcie wniosku o ścisłym powiązaniu między powstawaniem sept i rozgałęzieniem. Liczba i wielkość tworzących się rozgałęzień jest cechą przypisywaną danemu szczepowi grzyba nitkowego (Nielsen, 1992).

W celu ilościowego scharakteryzowania morfologii rozgałęzionych form grzybów strzępkowych wprowadzono (Caldwell i Trinci, 1973) pojęcie długości jednostki wzrostu strzępki (*hyphal growth unit*, HGU). Jest ona definiowana jako całkowita długość strzępki dzielona przez liczbę wierzchołków. Długość HGU (L_{HGU}) jest bardzo wartościowym parametrem ilościowym opisującym morfologię grzybów nitkowych, a z tego powodu, że strzępki grzybní się rozgałęziają podczas wzrostu, wynika duża różnorodność morfologiczna grzybów strzępkowych w hodowlach wglębnych, o czym będzie mowa w rozdziale 2.3.

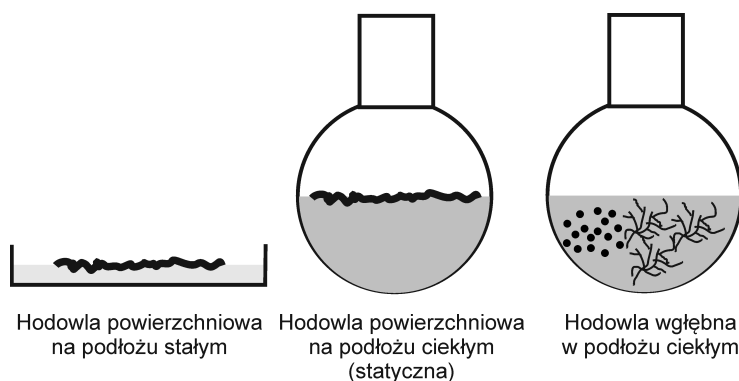
2.2.4. Sporulacja

U przemysłowych szczepów *Penicillium* i *Aspergillus* hodowanych metodą wglębną rzadko obserwuje się proces sporulacji z wytworzeniem bezpłciowych konidiospor. Wynika to z faktu, że fizyczna natura ścian komórkowych w hodowli wglębnej utrudnia ten proces (Smith, 1978). Badania procesów ciągłych wykazały jednak, że głównym czynnikiem wpływającym na sporulację jest stosunek węgla do azotu w podłożu hodowanym. Sporulacja pojawia się wyłącznie w warunkach silnego deficytu azotu i raczej przy niewielkich szybkościach rozcieńczania w bioreaktorach o działaniu ciągłym. Natomiast w hodowli powierzchniowej układy konidialne naturalnie powstają i ten typ hodowli jest rezerwuarem konidiospor niezbędnych do inokulacji kolejnych procesów wglębnych.

Proces wytworzenia konidiospor przebiega w trzech etapach. Pierwszym etapem jest wyrastanie konidiofora. Polega to na tym, że jedna z komórek wegetatywnych przekształca się w komórkę stożę, z której wyrośnie konidiofor. Sygnałem do jego wytworzenia jest deficyt substancji odżywczych. W drugim etapie na szczycie konidioforu powstaje główka (*Aspergillus*) lub rozwidlenie (*Penicillium*). Te elementy są wyraźnie zaznaczone na rys. 2.4. Na nich powstają specjalne komórki zwane fialidami, które następnie przez pączkowanie wytworzą konidiospory (etap trzeci). Konidiospory posiadają barwniki, które nadają im kolor i są ważną cechą charakterystyczną dla danego gatunku grzyba.

2.3. Hodowla mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach

Grzyby strzępkowe oraz promieniowce hodowane są w laboratoriach i w przemyśle na kilka sposobów. Niezależnie od skali bioreaktora, to znaczy od tego, czy jest to płytka Petriego, taca o powierzchni kilku metrów kwadratowych, kolba o objętości kilkuset mililitrów czy też bioreaktor o objętości od kilku do kilkuset litrów, wyróżnia się trzy sposoby hodowli (formy wzrostu) mikroorganizmów strzępkowych (rys. 2.6).

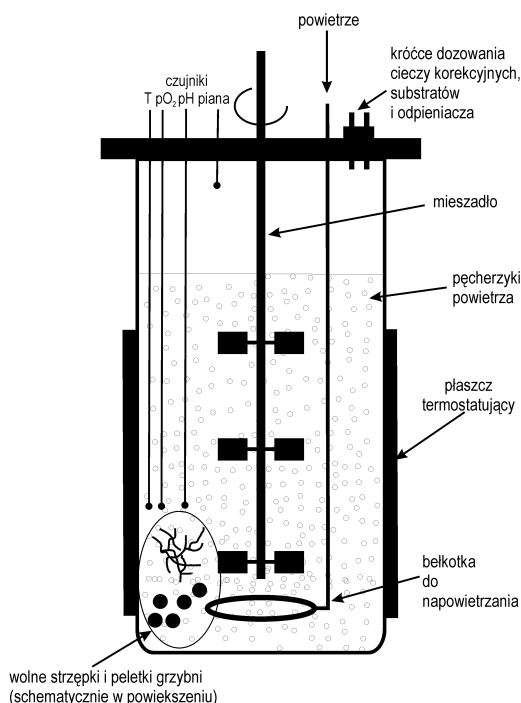


Rys. 2.6. Schematyczne porównanie wzrostu mikroorganizmów strzępkowych w hodowli głębokiej i powierzchniowej

Źródło: opracowanie własne.

Naturalnym sposobem wzrostu grzybów i promieniowców (tak zazwyczaj rosną one w przyrodzie) jest hodowla powierzchniowa na podłożu stałym. Strzępki wyrastają z kielkujących spor, wydłużając się zarówno w głąb podłoża, jak i w górę w kierunku powietrza. Również istnieją bioreaktory przemysłowe, w których taki wzrost grzybni jest wykorzystywany. Taką technikę w różnych konfiguracjach bioreaktorów o różnej konstrukcji nazywa się *Solid State Fermentation* (SSF). W hodowlach laboratoryjnych mamy również do czynienia ze wzrostem powierzchniowym na ciepleym podłożu i taką hodowlę nazywamy statyczną. Jednak najczęściej stosowanym typem hodowli jest hodowla głęboka, która charakteryzuje się tym, że spory i kielkujące z nich strzępki są w pełni zanurzone w ciepleym podłożu, które jest mieszane. I właśnie inżynieria morfologiczna, będąca przedmiotem tego opracowania, dotyczy tego ostatniego typu hodowli. Hodowla głęboka nie jest naturalna dla mikroorganizmów strzępkowych, ale ze względu na łatwość sterowania takimi parametrami procesowymi, jak temperatura, pH, nasycenie tlenem podłoża (pO_2) oraz wymieszanie zawiesiny jest ona tak chętnie stosowana. Istnieje wiele rozwiązań konstrukcyjnych bioreaktorów do takiej hodowli. Klasyfikuje się je często pod względem sposobu dostarczenia energii mechanicznej do bioreaktora. Mamy więc bioreaktory mieszane tylko fazą gazową przez napowietrzanie, jak kolumny barbotażowe czy *air-lift* oraz bioreaktory zbiornikowe mieszadłowe, w których energię wprowadza się zarówno poprzez fazę gazową (napowietrzanie), jak i fazę cieplą (proces mieszania za pomocą mieszadła). Ponieważ niniejsza monografia jest poświęcona morfologii i inżynierii morfologicznej mikroorganizmów strzępkowych, omawiane zagadnienia będą odnoszone do napowietrzanych bioreaktorów zbiornikowych mieszadłowych. Wynika to z tego, że jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój mikroorganizmów strzępkowych z utworzeniem określonej formy morfologicznej są naprężenia mechaniczne występujące podczas hodowli w takim bioreaktorze. W napowietrzanym bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym są dwa źródła dostarczania energii mechanicznej (mieszadło i pęcherzyki powietrza), dlatego naprężenia oddziału-

jące na morfologię mikroorganizmów strzępkowych w nich hodowanych są najsilniejsze. Z tego też powodu większość badań na temat wpływu morfologii mikroorganizmu na przebieg procesu hodowli prowadzi się właśnie w tego typu bioreaktorach. Nie oznacza to jednak, że ten typ bioreaktora jest optymalny do każdej hodowli z udziałem mikroorganizmów strzępkowych. Jednak te rozważania wykraczają poza tematykę niniejszej monografii. Na rys. 2.7 jest przedstawiony typowy bioreaktor zbiornikowy mieszadłowy do hodowli mikroorganizmów.



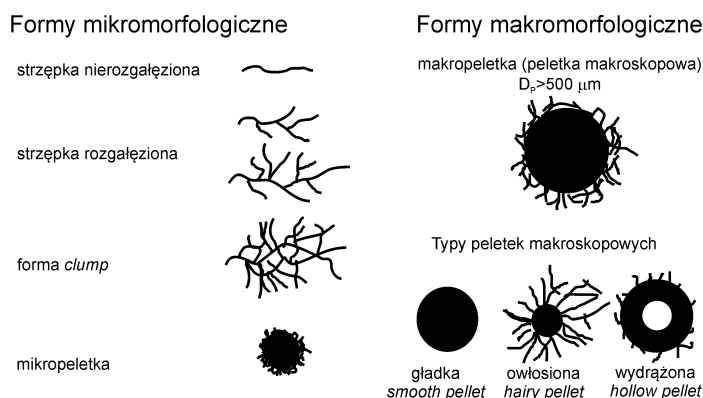
Rys. 2.7. Typowy bioreaktor zbiornikowy mieszadłowy do hodowli wglębnej mikroorganizmów w tym promieniowców i grzybów strzępkowych

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Składa on się ze zbiornika o stosunku wysokości do średnicy równym 2. Zazwyczaj jest wyposażony w mieszadła turbinowo-tarczowe Rushtona umieszczone po kilka sztuk na wale. Napowietrzanie prowadzone jest przez perforowaną rurkę zwaną bełkotką. Każdy bioreaktor jest termostatowany, z tego względu że większość procesów biotechnologicznych prowadzi się w stałej temperaturze. Niezbędnymi podstawowymi czujnikami są czujnik nasycenia tlenem podłoża pO₂ (sonda tlenowa), często sprzężona z układem sterowania poziomem nasycenia tlenem podłoża przez mieszanie i napowietrzanie, czujnik (elektroda) pH z możliwością sterowania jego poziomem przez wprowadzenie do bioreaktora cieczy korekcyjnych (kwasy i alkalia) oraz czujnik piany. Ten ostatni daje sygnał do włączenia zbijacza piany lub pompy dozującej chemiczny odpieniacz (olej silikonowy lub rzadziej olej jadalny).

2.3.1. Morfologia mikroorganizmów strzępkowych w hodowli wglębnej

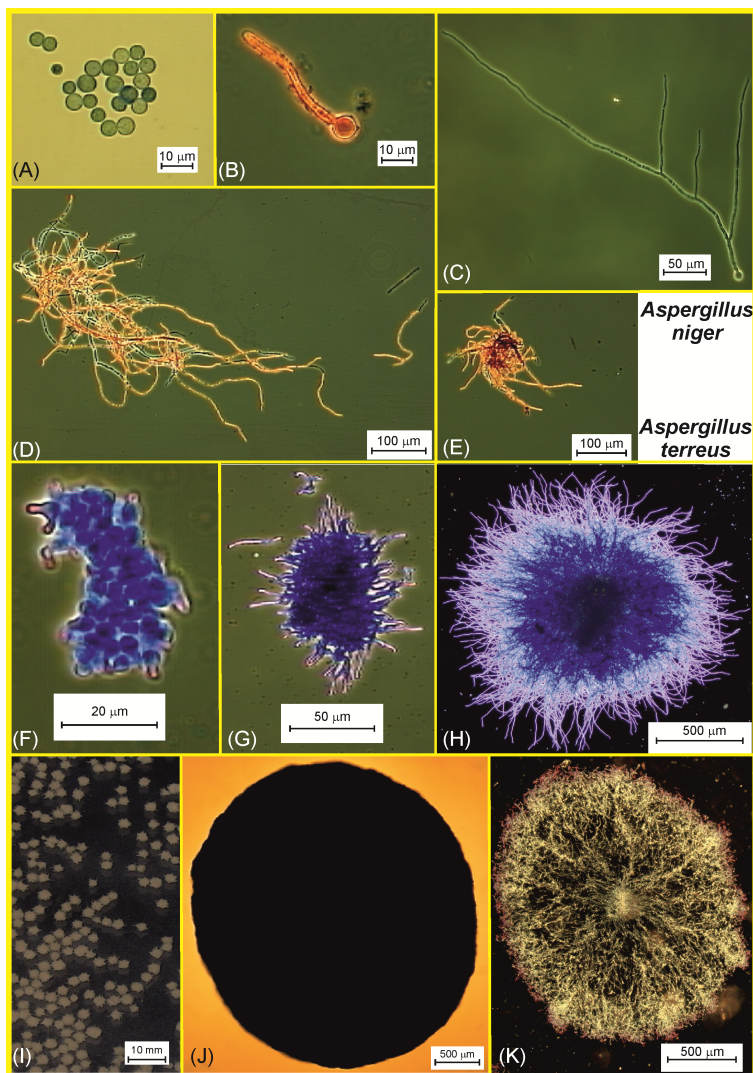
W warunkach hodowli wglębnej mikroorganizmy strzępkowe nie różnicują się w takim stopniu, jak dzieje się to podczas ich naturalnego wzrostu na podłożu stałym (rozdz. 2.1 i 2.2). Przede wszystkim nie wytwarzają one artrospor (promieniowce) bezpłciowych, a tym bardziej płciowych spor (grzyby). Te procesy w hodowli wglębnej zachodzą niezmiernie rzadko. W hodowli wglębnej zależnie od warunków hodowli oraz czynników biologicznych i fizycznych (*vide*: rozdz. 2.2 i 4) mikroorganizmy strzępkowe mogą przyjmować formy morfologiczne przedstawione na rys. 2.8.



Rys. 2.8. Formy morfologiczne mikroorganizmów strzępkowych

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Formy morfologiczne grzybów strzępkowych i promieniowców dzielimy na formy mikromorfologiczne oraz makromorfologiczne. Różnią się one przede wszystkim wielkością, a więc i możliwością ich obserwacji z wykorzystaniem standardowego mikroskopu świetlnego. Przeciętna średnica (grubość strzępki) grzyba strzępkowego waha się od 5 μm do 10 μm , ale długość pojedynczych strzępek może osiągać nawet kilkaset mikrometrów. „Strzępki” promieniowców są znacznie cieńsze (poniżej 5 μm), długością zaś nie muszą ustępować strzępkom grzybów. Do form mikromorfologicznych zaliczamy więc strzępki nierozgałęzione, rozgałęzione, formy typu *clump* i mikroskopowe peletki (rys. 2.8). Strzępki nierozgałęzione pojawiają się we wczesnych etapach hodowli wglębnych w wyniku kiełkowania spor i wydłużania się strzępek, aż do momentu pojawienia się pierwszego rozgałęzienia oraz jako oderwane fragmenty grzybni od większych struktur. Strzępka rozgałęziona powstaje w wyniku procesów wzrostu omówionych w rozdziałach 2.1 i 2.2 i tak długo możemy nazywać taką strzępkę rozgałęzioną, dopóki nie pojawią się pierwsze zapętlenia rozgałęziających się strzępek. Wtedy już mamy do czynienia z formą typu *clump*.



Rys. 2.9. Różne formy morfologiczne *Aspergillus niger* (A-E) oraz *Aspergillus terreus* (F-K): konidiospory (A), strzępka nierozgałęziona (B), strzępka rozgałęziona (C), forma *clump* (D), mikroskopowa peletka (E), zaglomerowane spory (F), mikroskopowe peletki różnej wielkości (G i H), makroskopowe peletki – obraz fotograficzny (I), makroskopowa peletka obraz z mikroskopu świetlnego, uzyskano tylko cień obiektu bez widoczności jakiegokolwiek struktury (J) oraz przekrój makroskopowej peletki wykonany techniką histologiczną i obserwowany w mikroskopie świetlnym (K)

Źródło: opracowanie własne.

Takie idealnie rozgałęzione strzępki obserwujemy także we wczesnych godzinach wzrostu grzybni oraz czasami jako przypadkowe struktury powstałe w wyniku oderwania od większych aglomeratów. W hodowlach, w których mamy do czynienia z formami mikromorfologicznymi, zazwyczaj dominują formy typu *clump*. Wynika to z mieszania zawiesiny grzybni i dużej koncentracji

strzępek w podłożu. Wywijania się strzępek i tworzenia zapętleń w takiej sytuacji nie da się uniknąć. Czasami też pojawiają się mikroskopowe peletki. Formę *clump*, która jest zawsze formą mikroskopową, to odróżnia od peletki, że nie posiada ona zwartego jądra ze zbitych strzępek. Peletki o rozmiarze poniżej 500 μm (arbitralnie przyjęta wartość używana przez wielu badaczy) są nazywane peletkami mikroskopowymi (mikropeletkami). Mikroskopowe peletki pojawiają się na bardzo wczesnych etapach hodowli tych mikroorganizmów strzępkowych, które mają tendencję do późniejszego tworzenia peletek makroskopowych. Takie mikropeletki mają idealny regularny kształt, szczególnie u grzybów z rodzaju *Aspergillus* (vide: rozdz. 2.3.2). Również w starszych hodowlach z formami mikromorfologicznymi powstają mikroskopowe peletki, ale pod wpływem oddziaływania naprężeń mechanicznych panujących w bioreaktorze z form typu *clump*, ich kształt jest wtedy dość nieregularny. Jeżeli w danej hodowli mikroorganizmu strzępkowego mamy do czynienia wyłącznie z wyżej opisanymi formami mikromorfologicznymi, to mówimy, że mamy do czynienia z morfologią rozproszoną grzybni (*dispersed morphology*). Kiedy w hodowlach wgłębnych występują jeszcze większe peletki, których średnica znacznie przekracza 1000 μm , osiągając w skrajnych przypadkach nawet wielkość 10 000 μm , nazywamy je peletkami makroskopowymi (makropeletkami), a taką morfologię grzybni morfologią zwartą lub speletyzowaną (*pelleted morphology*). Takie peletki są z łatwością obserwowane gołym okiem, a ich obrazy nie mogą być wykonane przy użyciu standardowego mikroskopu, gdyż te obiekty są po prostu za duże i nieprzepuszczalne dla promieni świetlnych. Mechanizmom tworzenia tego rodzaju peletek zostanie poświęcony kolejny podrozdział. Na rys. 2.9 przedstawiono zdjęcia strzępek grzybów z rodzaju *Aspergillus*, pokazujące wszystkie wyżej wymienione formy morfologiczne. W przypadku *Aspergillus niger* są to formy mikromorfologiczne (morfologia rozproszona), zaś w przypadku *Aspergillus terreus* morfologia zarta (przejście od mikropeletek do makropeletek).

2.3.2. Mechanizm tworzenia aglomeratów przez mikroorganizmy strzępkowe w hodowlach wgłębnych w bioreaktorach

Pierwsze badania nad mechanizmem tworzenia aglomeratów u mikroorganizmów strzępkowych przeprowadzili Takahashi *et al.* (1958) oraz Takahashi i Yamada (1959), których artykuły ukazały się w języku japońskim. Jednakże są one powszechnie cytowane w wielu późniejszych pracach przeglądowych. Na podstawie tych i późniejszych badań nad morfologią mikroorganizmów strzępkowych stwierdzono, że istnieją trzy mechanizmy tworzenia się aglomeratów (peletek) w hodowli wgłębnej (Metz i Kossen., 1977; Nielsen, 1996; Papagianni, 2004). Określono je na podstawie obserwacji mikroskopowych wczesnego etapu wzrostu mikroorganizmów od momentu wprowadzenia spor do podłoża do rozwinięcia się zwartych form morfologicznych. Te mechanizmy oczywiście dotyczą wyłącznie tych gatunków promieniowców i grzybów strzępkowych, które posiadają zdolność tworzenia spor. Również muszą być spełnione warunki

hodowli sprzyjające tworzeniu się aglomeratów. Warunki i czynniki wpływające na tworzenie się peletek promieniowców i grzybów strzępkowych będą omówione w rozdziale 5.1.

Zatem wyróżnia się następujące mechanizmy tworzenia peletek u mikroorganizmów strzępkowych (rys. 2.10). Są to:

- mechanizm niekoagulacyjny (nieagregacyjny, nieaglomeracyjny), przy którym nie występuje agregacja spor, a peletka tworzy się w wyniku kiełkowania pojedynczej spory i rozrostu strzępek (wydłużanie się strzępek, ich rozgałęzianie się) wokół tejże spory,
- mechanizm koagulacyjny (agregacyjny, aglomeracyjny), który polega na tym, że spory najpierw agregują, a następnie z tych agregatów wyrastają strzępki, które się wydłużają, rozgałęziają, tworząc ostatecznie makroskopową peletkę,
- mechanizm agregacji (aglomeracji) strzępek, przy którym same spory nie agregują, ale z nich wyrastają strzępki i dopiero te strzępki tworzą gęstsze struktury najpierw typu *clump* i wreszcie peletki.

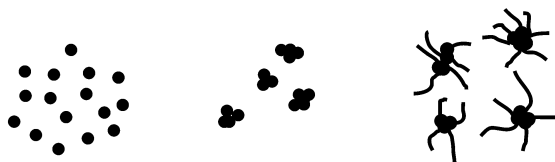
Do pewnego stopnia mechanizm tworzenia peletek da się przypisać do konkretnych grup mikroorganizmów strzępkowych. Mechanizm niekoagulacyjny występuje u promieniowców (*Streptomyces*) oraz u grzybów niższych z klasy *Zygomycetes* (*Mucor* sp., *Rhizopus* sp.), koagulacyjny u grzybów z rodzaju *Aspergillus*, a agregacja strzępek u *Penicillium*. Znalezione jednak pewne wyjątki od tej reguły, a dotyczą one na przykład promieniowców. Otóż u *Streptomyces tendae* oraz *Streptomyces aureofaciens* opisano niekoagulacyjny mechanizm tworzenia peletek (Tresner *et al.*, 1967; Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990), natomiast artrospory *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* zachowują się jak spory grzybów z rodzaju *Aspergillus* sp. i wykazują mechanizm koagulacyjny tworzenia peletek (O’Cleirigh *et al.*, 2005)

Najwięcej wyników badań opisywanych w literaturze dotyczy agregacji spor u grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*. Przede wszystkim wynika to z szerokich zastosowań tych grzybów ze względu na metabolity przez nie wytwarzane oraz fakt, że akurat te grzyby tworzą eleganckie kuliste i często bardzo duże peletki. Jest to oczywiście związane z koagulacyjnym mechanizmem ich tworzenia. Przyglądając się bardziej szczegółowo procesowi agregacji spor grzybów z rodzaju *Aspergillus*, okazało się, że ten proces jest dość złożony. Szczegółowe badania doprowadziły nawet do zaproponowania konkretnego modelu aglomeracji spor dla *Aspergillus* sp. Grimm *et al.* (2004) zaproponowali dwuetapowy model agregacji spor na podstawie badań prowadzonych w bioreaktorze zbiornikowym mieszałkowym ze szczepem *Aspergillus niger* AB 1.13 wytwarzającym α -glukoamylazę. Model ten został sformułowany na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych w pomiarach *in-line*, prowadzonych za pomocą laserowego analizatora wielkości cząstek. Zasada pomiaru polegała na tym, że wielkości cząstek uznanych za spory i małe aglomeraty mieściły się w zakresie 0-10 μm , a zmniejszenie liczby cząstek tej wielkości w badanym układzie było pośrednim dowodem na utworzenie się większych aglomeratów, czyli peletek. Pomiar taki pozwalał na odróżnienie na podstawie wielkości

obiektów tych spor, które jeszcze nie uległy agregacji od tych, które jej uległy (większe obiekty) i tych, które już wykiełkowały.



Mechanizm nieaglomeracyjny (nieagregacyjny)



Mechanizm aglomeracyjny (agregacyjny)



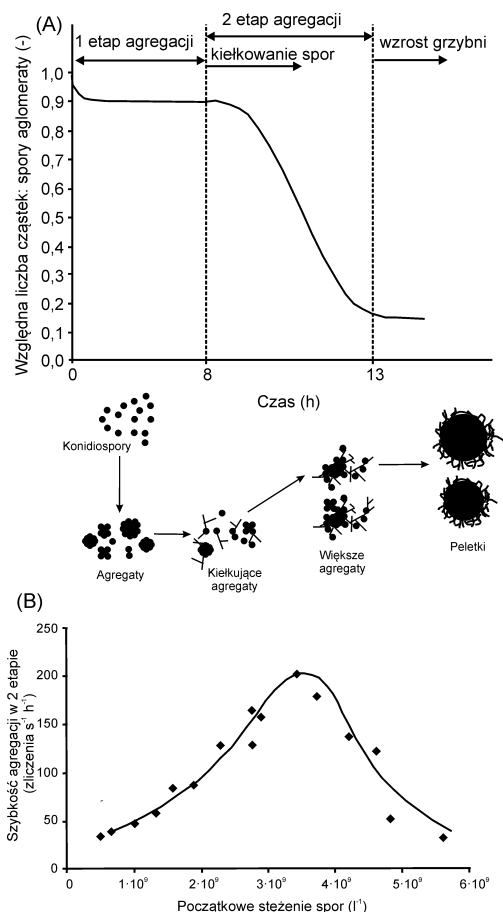
Mechanizm aglomeracji (agregacji) strzępek

Rys. 2.10. Trzy mechanizmy tworzenia się peletek u mikroorganizmów strzępkowych

Źródło: opracowanie własne.

Dla *Aspergillus niger* AB 1.13 proces tworzenia peletek w bioreaktorze przebiega zatem następująco. W pierwszym etapie trwającym około 8 godzin około 10% spor obecnych w podłożu ulega prawie natychmiastowej agregacji w ciągu pierwszych minut procesu. Następnie nic się nie dzieje, a utworzone agregaty spor pozostają niezmienione. Później jednak spory zawarte w tych agregatach kiełkują, jednocześnie uruchamiając drugi etap agregacji spor, trwający kolejne 5 godzin. Pozostałe po pierwszym etapie wolne spory łączą się z istniejącymi agregatami i strzępkami z nich wyrastającymi (rys. 2.11a). Szybkość agregacji zależy od liczby spor wprowadzonych do podłoża (rys. 2.11b).

Po drugim etapie ponad 80% spor wprowadzonych początkowo do podłoża zostaje powiązanych z innymi sporami i strzępkami. Dopiero wtedy zaczyna się właściwy wzrost grzybni i formowanie się peletek. Na rys. 2.11a ten dwuetapowy model tworzenia aglomeratów przez *Aspergillus niger* AB 1.13 został również zwizualizowany. Należy jednak pamiętać, że autorzy tego modelu podkreślili, że ani efekt sił mechanicznych, ani efekty oddziaływań sił powierzchniowych między sporami nie były brane pod uwagę w tym opisie.

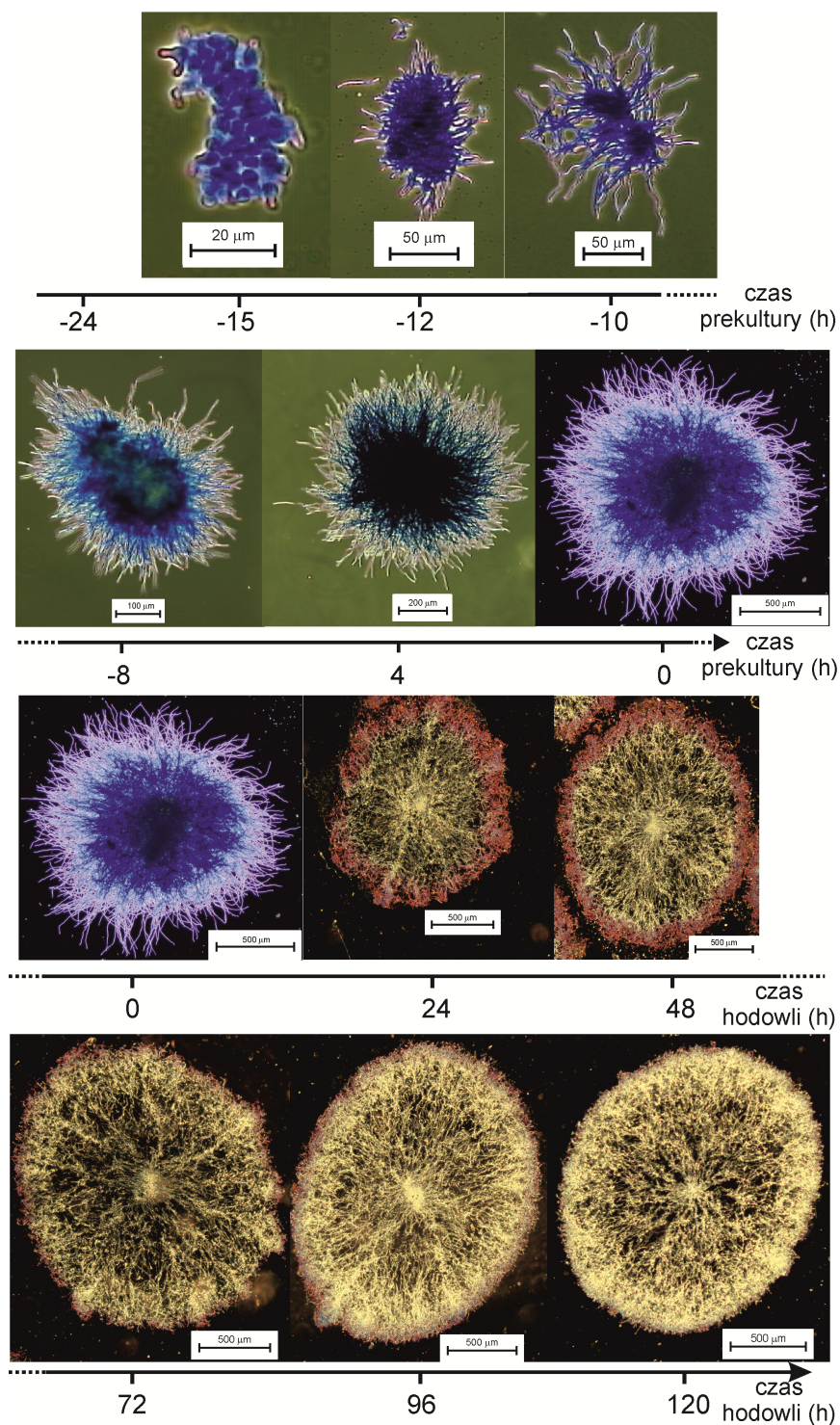


Rys. 2.11. Dwuetapowa agregacja spor *Aspergillus niger* AB 1.13: przebieg procesu w czasie (A), szybkość agregacji w drugim etapie w zależności od liczby spor wprowadzonych do podłoża (B)

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Grimm *et al.* (2004).

Nieco inaczej wygląda proces aglomeracji spor u *Aspergillus terreus* w dwuetapowej (prekultura-podłoże produkcyjne) hodowli wstrząsanej. Po wprowadzeniu spor do podłoża inokulacyjnego następuje bardzo szybka ich agregacja, tak iż około 8 godziny nie obserwuje się wolnych spor. Średnio na jedną peletkę przypada około 10400 zaglomerowanych spor zdolnych do kiełkowania (ich liczbę w hodowli wyznaczono metodą płytkową). Z utworzonych agregatów kiełkują strzępki i dopiero one tworzą charakterystyczną promienistą strukturę wewnątrz peletek (rys. 2.12). W nielicznych przypadkach obserwuje się tendencję do agregacji małych peletek, co później powoduje utworzenie nieidealnie kulistych makroskopowych peletek w późniejszych godzinach hodowli. Powyższy opis powstał na podstawie obserwacji mikroskopowych bez ilościowego określenia liczby spor zagregowanych i niezagregowanych (Bizukojć i Ledakowicz, 2010).

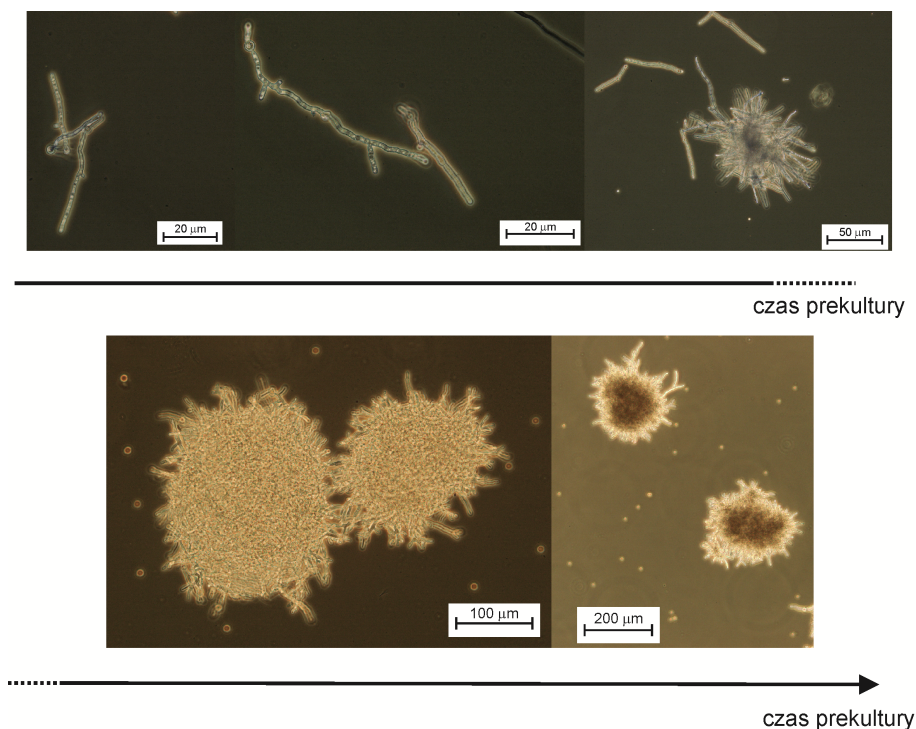
2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych



Rys. 2.12. Tworzenie i wzrost makroskopowych peletek u *Aspergillus terreus*

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Bizukojć i Ledakowicz (2010).

Zupełnie inaczej wygląda kiełkowanie spor i tworzenie peletek grzybów z rodzaju *Penicillium* (na przykładzie *Penicillium solitum*) w ciągu pierwszych kilkunastu godzin od wprowadzenia spor do podłoża, pokazano to na rys. 2.13. Na początku procesu wzrostu można wyróżnić wiele form mikromorfologicznych, wśród których widać kiełkujące pojedyncze spory, większe i mniejsze aglomeraty i ostatecznie uformowane jeszcze mikroskopowe peletki. Czas rozwoju tych strzępek odpowiada czasowi prekultury dla *Aspergillus terreus* przedstawionemu na rys. 2.12.



Rys. 2.13. Tworzenie zwartych form morfologicznych przez *Penicillium solitum*

Źródło: opracowanie własne.

Podsumowując ten rozdział, należy przede wszystkim podkreślić, że forma morfologiczna grzybni, tworząca się w danym procesie bioreaktorowym, ma ogromne znaczenie na jego przebieg. Przede wszystkim od formy wzrostu promieniowców i grzybów strzępkowych zależy wytwarzanie metabolitów pierwotnych, metabolitów wtórnych oraz enzymów.

Czasami znana jest optymalna forma morfologiczna dla biosyntezy konkretnego metabolitu. Co więcej, sam przebieg procesu bioreaktorowego z udziałem promieniowców czy grzybów strzępkowych wyraźnie się różni w zależności od formy morfologicznej i wymaga odmiennego sterowania takimi parametrami procesowymi, jak prędkość mieszania czy szybkość napowietrzania. Z tego wy-

nika, że zawiesina mikroorganizmów strzępkowych o morfologii rozproszonej albo zwartej (speletyzowanej) wykazuje nie tylko odmienne właściwości biologiczne i biochemiczne, ale także mechaniczne, fizykochemiczne i hydrodynamiczne.

2.4. Mierzalne parametry wykorzystywane dla form morfologicznych mikroorganizmów strzępkowych

W rozdziale 2.3 zostały opisane tworzące się w hodowlach wglębnych formy morfologiczne mikroorganizmów strzępkowych. Jednakże, przedstawiony powyżej opis jakościowy nie jest wystarczający do uwzględnienia wpływu formy morfologicznej mikroorganizmu strzępkowego, szczególnie w kontekście ilościowego opisu procesu bioreaktorowego. Co więcej, wpływ morfologii mikroorganizmu na biosyntezę danego metabolitu (*vide*: rozdz. 3) oraz właściwości brzezki hodowlanej (*vide*: rozdz. 4) zależy nie tylko od formy morfologicznej jako takiej, ale także od wielkości utworzonych obiektów.

Najważniejszym narzędziem pozwalającym na ilościowy opis morfologii mikroorganizmów strzępkowych jest cyfrowa analiza obrazów, zarówno tych mikroskopowych (w przypadku form mikromorfologicznych), jak i makroskopowych wykonywanych innymi urządzeniami do digitalizacji obrazów, do których należą cyfrowe aparaty fotograficzne lub skanery (dotyczy dużych aglomeratów grzybni). Pomiar wielkości obiektów, którego ostatecznym celem jest uzyskanie wartości tak zwanych parametrów morfologicznych, polega zazwyczaj na:

- przetworzeniu obrazu RGB do obrazu w skali szarości,
- korekcie tła, jeśli potrzebne, oraz oddzieleniu obrazu obiektu od tła (segmentacja obrazu),
- przetworzeniu zsegmentowanego obrazu w obraz binarny połączone często z usunięciem artefaktów (obiekty niebędące strzępkami czy peletkami),
- pomiarze wielkości strzępek i peletek na obrazie binarnym i uzyskaniu wartości parametrów morfologicznych, wyrażających wielkość obiektów.

Aby uzyskać fizyczną wielkość obiektu, wyrażoną w jednostkach długości, trzeba najpierw uzyskać obraz obiektu o znanej wielkości (szkiełko mikroskopowe ze skalą) lub inny obiekt o dokładnie znanej wielkości, a następnie wyznaczyć, ile pikseli obrazu przypada na jednostkę długości (stała kalibracji). W przypadku pomiaru wielkości mikroorganizmów strzępkowych jest to najczęściej piksel μm^{-1} .

W tabeli 2.1 przedstawiono definicje parametrów morfologicznych używanych podczas pomiarów z wykorzystaniem technik cyfrowej analizy obrazu.

Tabela 2.1. Definicje parametrów morfologicznych uzyskiwanych z cyfrowej analizy obrazu







Parametr	Definicja i wzór	Rysunek pomocniczy
Wielkość obiektów		
Pole powierzchni rzutu (<i>projected area</i>), A	Powierzchnia rzutu obiektu trójwymiarowego na obraz dwuwymiarowy. Jest to liczba pikseli obrazu pomnożona przez stałą kalibracji w kwadracie	
Obwód (<i>perimeter</i>), P	Długość granicy obiektu	
Obwód wypukły (<i>convex perimeter</i>), P_C	Długość granicy obiektu uzyskana przez połączenie zewnętrznych punktów obiektów (wyrównanie zagłębień)	
Pole powierzchni rzutu wypukłe (<i>convex projected area</i>), A_C	Pole wewnątrz obwodu wypukłego	
Długość (<i>length</i>), L	Długość obiektu prostokątnego mającego tę samą powierzchnię i obwód jak obiekt mierzony: $L = \frac{P + \sqrt{P^2 - 16 \cdot A}}{4}$	—
Szerokość obiektu (<i>width</i>), W	Szerokość obiektu prostokątnego mającego tę samą powierzchnię i obwód jak ten obiekt mierzony: $W = \frac{P - \sqrt{P^2 - 16 \cdot A}}{4} = \frac{A}{L}$	—
Grubość (<i>breadth</i>) i wysokość (<i>height</i>)	Parametr uzyskiwany przez pomiar Fereta (przy użyciu suwmiarki czy macek)	
Średnica zastępcza (<i>equivalent diameter</i>), D	Średnica koła o takim samym polu powierzchni jak mierzony obiekt $D = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}}$	—
Maksymalny wymiar obiektu (<i>maximum distance</i>)	Najdłuższa długość Fereta mierzona przez pole wypukłe obiektu	
Liczba obiektów		
Liczba obiektów	—	—
Liczba wierzchołków	—	—

Tabela 2.1 (cd.)

Kształt obiektów		
Kolistość (<i>circularity</i>), C	Czynnik opisujący na ile obiekt odbiega kształtem od idealnego koła: $C = 1$ dla koła, $C > 1$ dla kształtów odbiegających od koła: $C = \frac{P^2}{4 \cdot \pi \cdot A}$	–
Szorstkość (<i>roughness</i>), R	Miara nieregularności obwodu (brzegu) obiektu. Uzyskuje się ją przez pomiar kolistości wokół granicy obiektu	–
Zwartość obiektu (<i>fullness, solidity</i>), F	Miara „owłosienia” obiektu Stosunek pola powierzchni rzutu obiektu do jego pola wypukłego, jeśli obiekt jest gładki to $F = 1$. Dla niegładkich obiektów $F < 1$	–
Wydłużenie (<i>elongation, aspect ratio</i>), E	Stosunek szerokości do długości obiektu	–

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Paul i Thomas (1998).

Natomiast w tabeli 2.2 zostały zestawione parametry morfologiczne wykorzystywane do określania wielkości konkretnych form morfologicznych mikroorganizmów strzępkowych.

Tabela 2.2. Zestawienie parametrów morfologicznych mierzonych dla różnych form morfologicznych mikroorganizmów strzępkowych z wykorzystaniem technik cyfrowej analizy obrazu

Forma morfologiczna	Parametr morfologiczny
Formy mikromorfologiczne	
Strzępki nierozgałęzione	<ul style="list-style-type: none"> • Całkowita długość strzępki • Średnia szerokość strzępki • Pole powierzchni rzutu strzępki bądź ułamek pola powierzchni rzutu strzępki
Strzępki rozgałęzione	<ul style="list-style-type: none"> • Całkowita długość strzępki • Długość pojedynczego rozgałęzienia • Najdłuższa długość obiektu • Liczba wierzchołków • Odległość międzywęzłowa (między rozgałęzieniami) • Długość i objętość HGU (stosunek długości lub objętości strzępki do liczby wierzchołków) • Pole powierzchni rzutu strzępki bądź ułamek pola powierzchni rzutu strzępki
Proste strzępki <i>clump</i> (nie więcej niż 1-3 „dziury” lub zapętlenia)	<ul style="list-style-type: none"> • Całkowita długość strzępki • Maksymalny wymiar obiektu (między najdalszymi końcówkami strzępek) • Liczba wierzchołków • Odległość międzywęzłowa (między rozgałęzieniami) • Długość i objętość HGU (stosunek długości lub objętości strzępki do liczby wierzchołków) • Szorstkość obiektu • Zwartość obiektu • Pole powierzchni rzutu strzępki bądź ułamek pola powierzchni rzutu strzępki

Tabela 2.2 (cd.)

Złożona – strzępki <i>clump</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Maksymalny wymiar obiektu (między najdalszymi końcówkami strzępek) • Pole powierzchni rzutu strzępki bądź ułamek pola powierzchni rzutu strzępki • Szorstkość obiektu • Zwartość obiektu
Formy makromorfologiczne (poniższe parametry również dotyczą małych peletek jako form mikromorfologicznych)	
Peletki	<ul style="list-style-type: none"> • Pole powierzchni rzutu peletki • Pole powierzchni rzutu pierścienia złożonego ze strzępek peletki i pole powierzchni rzutu jądra peletki • Pole powierzchni wypukłe peletki • Kolistość peletki, • Kolistość jądra peletki, • Wydłużenie • Stosunek strzępkowy (<i>filament ratio</i>) peletki*

* miara wprowadzona przez Rodriguez Porcel *et al.* (2005) i wyrażająca się wzorem: $A_F/(A_F+A_K)$, gdzie A_F jest polem powierzchni rzutu pierścienia złożonego ze strzępek peletki a A_K – polem powierzchni rzutu jądra peletki; ten parametr jest miarą „owłosienia” peletki dla peletek owłosionych (*hairy pellets*)

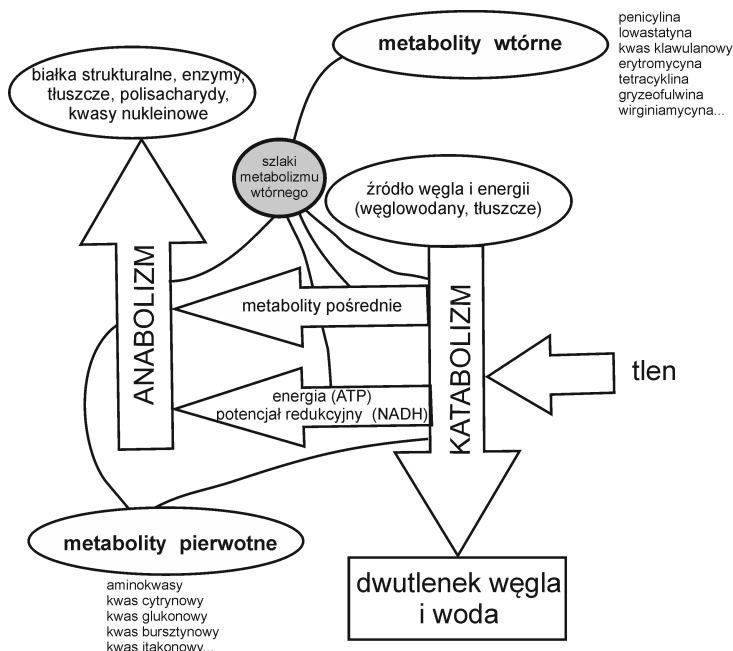
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Paul i Thomas (1998).

3. Morfologia mikroorganizmów strzępkowych a wytwarzanie metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz enzymów

Metabolizm organizmu to od kilkuset do kilku tysięcy reakcji biochemicznych katalizowanych przez enzymy, zachodzących w każdej żywej komórce. Celem metabolizmu jest utrzymanie organizmu przy życiu i jego rozmnażanie. Metabolizm dzieli się na dwie podstawowe gałęzie: katabolizm i anabolizm. Celem przemian katabolicznych jest uzyskiwanie energii, a w przypadku organizmów heterotroficznych, jak promieniowce i grzyby strzępkowe jest to utlenianie organicznych związków węgla do dwutlenku węgla w celu uzyskania potencjału redukcyjnego w postaci zredukowanego dinukleotydu nikotynoadeninowego NADH (glikoliza, cykl Krebsa) oraz energii w postaci adenozynotrójfosforanu ATP (fosforylacja oksydacyjna z wykorzystaniem tlenu jako ostatecznego akceptora elektronów). Przemiany anaboliczne to biosynteza cząsteczek, które składają się na strukturę komórki. Są to aminokwasy, kwasy tłuszczowe, mono-, di- i polisacharydy oraz zasady purynowe i pirymidynowe. Z aminokwasów powstaną następnie białka enzymatyczne i strukturalne, z kwasów tłuszczowych i glicerolu lipidy, będące na przykład składnikiem każdej błony komórkowej (podwójna błona białkowo-lipidowa), a polisacharydy staną się na przykład materiałem zapasowym. Zasady purynowe i pirymidynowe wraz z dezoksyrybozą i rybozą oraz kwasem fosforowym są składnikami struktury kwasów nukleinowych (DNA i różnych rodzajów RNA) będących przenośnikami informacji genetycznej. Ważnymi metabolitami, szczególnie grzybów strzępkowych, są enzymy hydrolityczne wydzielane na zewnątrz komórek, a ich funkcją jest umożliwienie przeżycia grzybom strzępkowym na takich trudnych substratach, jak celuloza czy drewno, i uzyskiwania z nich rozpuszczalnego w wodzie substratu węglowego dla katabolizmu.

Oprócz wyżej opisanego anabolizmu i katabolizmu, które razem tworzą, tzw. metabolizm pierwotny, mamy jeszcze do czynienia z metabolizmem wtórnym. Z różnych prekursorów metabolicznych pochodzących z metabolizmu pierwotnego w szlakach metabolizmu wtórnego są wytwarzane skomplikowane związki chemiczne. Te związki nie są teoretycznie niezbędne do życia mikroorganizmom strzępkowym, a ich pochodzenie biosyntetyczne jest bardzo różne. Są to pochodzące od aminokwasów alkaloidy, terpenoidy, modyfikowane cukry zwane glikozydami, naturalne fenole i fenazyny, poliketydy i niektóre kwasy tłuszczowe, peptydy nierybosomalne (tzn. syntezowane przez enzymy, a nie w rybosomach na matrycy mRNA) i wiele innych. Jednak ich wytwarzanie, choć energetycznie kosztowne, jest związane z oddziaływaniami ekologicznymi w miejscach bytowania promieniowców i grzybów strzępkowych. Większość tych związków ma działanie antybiotyczne i są one toksyczne dla innych mikroorganizmów, czasem też i organizmów wyższych. Są one zatem swoistego rodzaju „bronią chemiczną” umożliwiającą przetrwanie danemu gatunkowi pośród silnej konkurencji innych gatunków. Takimi oddziaływaniami w przyrodzie zajmuje się inna dziedzina wiedzy zwana ekologią biochemiczną. Dodajmy też,

że metabolity wtórne to nie tylko „wytwór” promieniowców i grzybów strzępkowych, ale także innych organizmów wyższych, jak rośliny czy zwierzęta. Na rys. 3.1 przedstawiono schematyczny tlenowy metabolizm organizmów heterotroficznych, do których należą promieniowce i grzyby strzępkowe z zaznaczeniem metabolizmu wtórnego.



Rys. 3.1. Metabolizm tlenowych mikroorganizmów heterotroficznych, w tym promieniowców i grzybów strzępkowych, wraz z zaznaczeniem niektórych użytecznych metabolitów pierwotnych i wtórnych

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Z łatwością można postawić tezę, że wytwarzanie metabolitów przez promieniowce i grzyby strzępkowe jest zawsze w jakiś sposób powiązane z formą morfologiczną tych mikroorganizmów. Z tym, że nigdy do końca nie jest jasne, czy optymalna forma morfologiczna jest zdeterminowana optymalnymi warunkami procesowymi panującymi w bioreaktorze specjalnie dobranymi dla biosyntezy danego metabolitu, czy też tak dobiera się warunki procesowe, żeby uzyskać optymalną formę morfologiczną dla wytwarzania pożądanego metabolitu. Właściwie obydwa podejścia są w pełni uzasadnione. Różne zależności pomiędzy formą morfologiczną promieniowców i grzybów strzępkowych a biosyntezą danego metabolitu były wielokrotnie ustalane i prezentowane w literaturze przedmiotu (tabela 3.1), zarówno jako opis jakościowy, czy też ilościowe zależności. Jednak często to nie oznacza, że jednoznacznie powiązano produktywność danego gatunku promieniowca czy grzyba strzępkowego z jego konkretną formą morfologiczną. Stąd dane w tabeli 3.1 należy traktować jako orientacyjne, a dokładne ustalenie wyżej opisywanych związków dla pojedyn-

czego metabolitu wymaga bardzo szczegółowego studium literaturowego, które nie musi prowadzić do sformułowania jednoznacznych wniosków. W niektórych przypadkach wręcz rozwinęła się dyskusja (kwas cytrynowy), która forma morfologiczna badanego mikroorganizmu (*Aspergillus niger*) jest bardziej użyteczna.

Tabela 3.1. Zestawienie wybranych metabolitów i enzymów mikroorganizmów strzępkowych wraz z powiązaniem ich biosyntezy z morfologią mikroorganizmu

Metabolit	Mikroorganizm strzępkowy	Rodzaj metabolitu	Optymalna morfologia	Wybrana literatura
Metabolity pierwotne				
kwas cytrynowy	<i>Aspergillus niger</i>	kwas organiczny	forma rozproszona lub peletki	Paul <i>et al.</i> (1999) Bizukojć i Ledakowicz (2003) Papagianni (2007)
kwas glukonowy	<i>Aspergillus niger</i>	kwas organiczny	peletki	El Enshasy <i>et al.</i> (1999)
Metabolity wtórne				
chloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	antybiotyk (związek aromatyczny)	rozproszona, po-fragmentowana grzybnia	van Wezel <i>et al.</i> (2006)
retamycyna	<i>Streptomyces olindensis</i>	poliketydowy antybiotyk z grupy antracyklin	rozproszona i formy typu „clump”	Pamboukian i Facciotti (2004)
daptomycyna	<i>Streptomyces roseosporus</i>	antybiotyk lipopeptydowy	rozproszona, pofragmentowana grzybnia	van Wezel <i>et al.</i> (2006)
lowastatyna	<i>Aspergillus terreus</i>	poliketydowy inhibitor reduktazy S-3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA	niewielkie peletki	Lai <i>et al.</i> (2005) Bizukojć i Ledakowicz (2010)
penicylina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	antybiotyk z grupy β-laktamów	forma rozproszona lub ewentualnie małe peletki; długość strzępek i liczba wierzchołków jest istotna	Smith i Calam (1980) Makagiansar <i>et al.</i> (1993) Vanhoutte <i>et al.</i> (1995)
cefalosporyna	<i>Cephalosporium acremonium</i> (<i>Acremonium chrysogenum</i>)	antybiotyk z grupy β-laktamów	bardzo krótkie strzępki, często drożdżopodobne komórki wytwarzana podczas tworzenia artrospor	El-Sabbagh <i>et al.</i> (2008) Queener i Ellis (1975)
geldanamycyna	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> var <i>geldanus</i>	poliketydowy antybiotyk z grupy makrolidów benzochinonowych	rozproszona, formy typu „clump” i niewielkie peletki	Dobson <i>et al.</i> (2008)
kwas klawulanowy	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	inhibitor bakteryjnej β-laktamazy	rozproszona, raczej słaby wpływ	Belmar-Beiny i Thomas (1991)
nystatyna	<i>Streptomyces noursei</i>	antybiotyk	rozproszona i formy typu <i>clump</i>	Jonsbu <i>et al.</i> (2002)
tylozyna	<i>Streptomyces fradiae</i>	poliketydowy antybiotyk z grupy makrolidów	rozproszona i formy typu <i>clump</i>	Tamura <i>et al.</i> (1997)
nikomycyna	<i>Streptomyces tendae</i>	antybiotyk nukleozydopeptydowy	peletki	Vecht-Lifshitz <i>et al.</i> (1992)

Tabela 3.1 (cd.)

awermektyna	<i>Streptomyces avermitilis</i>	poliketydowy antybiotyk z grupy makrolidów	peletki	Yin <i>et al.</i> (2008)
wirginiamycyna	<i>Streptomyces virginiae</i>	antybiotyk polipeptydowy	słaby wpływ	Yang <i>et al.</i> (1996)
Enzymy				
chloro-peroksydaza	<i>Caldariomyces fumago</i>	EC 1.11.1.10	forma rozproszona lub peletki	Carmichael i Pickard (1989) Kaup <i>et al.</i> (2008)
α -glukoamylaza	<i>Aspergillus niger</i>	EC 2.2.1.1	forma rozproszona, strzępki silnie rozgałęzione	Wösten <i>et al.</i> (1991) Gordon <i>et al.</i> (2000) Müller <i>et al.</i> (2002a)
oksydaza glukozowa	<i>Aspergillus niger</i>	EC 1.1.3.4	peletki	El Enshasy <i>et al.</i> (1999)

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Zależności między formą morfologiczną danego mikroorganizmu strzępkowego a biosyntezą pożądanego metabolitu mogą być bardzo różne. Na przykład:

- forma rozproszona jest preferowana dla danego metabolitu (kilka pozycji w tabeli 3.1),
- forma speletyzowana jest preferowana dla danego metabolitu (kilka pozycji w tabeli 3.1),
- średnica peletek wpływa na biosyntezę metabolitu np. u *Aspergillus terreus* na takim samym podłożu mniejsze peletki lepiej syntezują lowastatynę zaś większe, (+)-geodynę (Bizukojć i Ledakowicz, 2010),
- częstotliwość tworzenia rozgałęzień wpływa na produktywność mikroorganizmu, szczególnie w tych sytuacjach, gdy produkcja metabolitu zachodzi w komórkach wierzchołkowych; dotyczy przede wszystkim enzymów jak α -glukoamylaza (Wösten *et al.*, 1991; Gordon *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2002a); również długość strzępek i rozgałęzianie się strzępek ma znaczenie przy produkcji penicyliny (Makagiansar *et al.*, 1993; Smith i Calam, 1980; Vanhoutte *et al.*, 1995),
- obszar aktywnych komórek grzybów strzępkowych koreluje się z wytwarzaniem heterologicznych białek jak lizozym białka kurzego (Wongwicharn *et al.*, 1999), czy metabolitów wtórnych jak lowastatyna (Bizukojć i Ledakowicz, 2010),
- obszar zawakuolizowanych komórek grzybów strzępkowych koreluje się z wytwarzaniem metabolitu pierwotnego jak kwas cytrynowy (Bizukojć i Ledakowicz, 2003).

Lista użytecznych metabolitów wytwarzanych przez grzyby strzępkowe i promieniowce jest bardzo długa. Promieniowce na przykład wytwarzają na skalę przemysłową dwie trzecie znanych naturalnych antybiotyków do zastoso-

wań medycznych, a z tej liczby aż 80% to efekt metabolizmu promieniowców należących do rodzaju *Streptomyces* sp. Grzyby strzępkowe są podstawowymi producentami kwasów organicznych (kwas cytrynowy, kwas glukonowy, kwas itakonowy), szeregu enzymów (*Aspergillus* sp.), ale także antybiotyków, jak penicylina czy grzeofulwina (*Penicillium* sp.).

Dla wybranych przypadków przyjrzymy się dokładniej zależnościom między morfologią mikroorganizmu w hodowli węgłnej a biosyntezą danego metabolitu. W literaturze przedmiotu istnieją kontrowersje, która forma morfologiczna *Aspergillus niger* jest korzystniejsza do produkcji **kwasu cytrynowego** i można znaleźć na ten temat co najmniej kilkanaście publikacji. Na przykład Paul *et al.* (1999) przychylają się do formy rozproszonej. Zaobserwowali oni również lepszą wydajność kwasu cytrynowego w bioreaktorze z mniejszymi peletkami (ok. 1000 μm) niż z większymi (średnio 3500 μm). Tłumaczyli to dostępnością tlenu do komórek grzybni. Szczegółowa dyskusja na temat wpływu morfologii grzybni na produkcję kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* została przeprowadzona przez Papagianni (2007). Produkcja **kwasu glukonowego** odbywa się najczęściej w układach z immobilizowaną biomasą grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, zwykle *Aspergillus niger*. Ponieważ konwersja glukozy do kwasu glukonowego to pojedyncza reakcja enzymatyczna katalizowana oksydazą glukozową (EC 1.1.3.4), istnieją także doniesienia literaturowe na temat wpływu morfologii grzybni *Aspergillus niger* na wytwarzanie tego enzymu. Tutaj zdecydowanie speletyzowana grzybnia jest efektywniejsza (El Enshasy *et al.*, 1999). W przypadku **penicyliny** (*Penicillium chrysogenum*) panuje dość duża zgodność w literaturze i preferowane są tutaj formy mikromorfologiczne i wzrost grzybni w postaci rozproszonej (*inter alia*: Smith i Calam, 1980; Makagiansar *et al.*, 1993; Vanhoutte *et al.*, 1995). Przede wszystkim udowodniono ponad wszelką wątpliwość zależność między długością HGU, długością strzępek oraz częstością tworzenia rozgałęzień a biosyntezą penicyliny. Również powiązanie wytwarzania penicyliny z procesem różnicowania się strzępek grzybni. Ujęto te zależności nawet w formie morfologicznie strukturalnych modeli wzrostu (*inter alia*: Paul i Thomas, 1996; Zangirolami *et al.*, 1997). Biosynteza **lowastatyny** przez *Aspergillus terreus* prawie zawsze przebiega w układach ze speletyzowaną grzybnią (*inter alia*: Novak *et al.*, 1997; Casas Lopez *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005; Rodriguez Porcel *et al.*, 2005; Bizukojć i Ledakowicz, 2008). Jednak zostało udowodnione, że biosynteza lowastatyny jest tym efektywniejsza, im mniejsze peletki występują w hodowli (Lai *et al.*, 2005; Bizukojć i Ledakowicz, 2010; Bizukojć i Gonciarz, 2015). W przypadku wytwarzania **nystatyny** przez promieniowce dowiedziano przez barwienie fluorescencyjne, że tylko zewnętrzne części peletek pozostają aktywne (*Streptomyces noursei* ATCC 11455). Głębokość peletki, do której tlen penetruje „grzybnię”, została oceniona na 150 μm . Natomiast szczep mutant, tworzący formy luźniejsze (*Streptomyces noursei* NG7.19) typu *clump*, wykazywał znacznie większą aktywność biosyntetyczną. Ten szczep również nie wytwarzał długich „strzępek” (Jonsbu *et al.*, 2002). W biosyntezie **kwasu klawulanowego** ważnym czynnikiem jest długość „strzępek”, jakie tworzy promieniowiec *Streptomyces clavuligerus*. Fragmentacja „strzępek” sprzyja ich ponownemu

wzrostowi. Jednak w tym przypadku nie obserwowano bardzo ścisłego związku między morfologią „grzybni” a produkcją metabolitu (Belmar-Beiny i Thomas, 1991). Dla **daptomycyny** czy **chloramfenikolu** produkowanych przez promieniozwce rodzaju *Streptomyces* „grzybnia” pofragmentowana o krótkich strzępkach (w tym wypadku działa się tak w wyniku modyfikacji genetycznej polegającej na wzmocnieniu ekspresji genu SsgA, związanego z morfogenezą) sprzyja zwiększeniu wydajności biosyntezy tychże antybiotyków (van Wezel *et al.*, 2006).

4. Wpływ morfologii mikroorganizmów strzępkowych na prowadzenie ich hodowli wglębnych w bioreaktorach

Dlaczego morfologia mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach bioreaktorowych jest tak ważna? Połowa odpowiedzi na to pytanie została udzielona w rozdziale 3. Zawsze istnieje jakiś słabszy bądź silniejszy związek pomiędzy morfologią mikroorganizmów strzępkowych a wytwarzaniem przez nie metabolitów i enzymów. Oprócz tego podczas hodowli wglębnej promieniowców czy grzybów strzępkowych pojawia się szereg problemów technicznych będących wyzwaniem dla inżynierii biochemicznej. Biomasa mikroorganizmów strzępkowych zawieszona w podłożach płynnych, zależnie od jej formy morfologicznej, silnie wpływa na właściwości fizykochemiczne tychże podłoży, zwiększając przede wszystkim ich lepkość oraz zmieniając właściwości reologiczne zawiesiny, oddziałując na hydrodynamikę mieszania oraz warunki ruchu masy (przede wszystkim przenoszenie tlenu) w bioreaktorze. Z praktycznego punktu widzenia zależy nam na maksymalizacji wytwarzania danego metabolitu. Stwarzając jak najlepsze warunki wzrostu mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach wglębnych w bioreaktorach, musimy liczyć się z koniecznością uwzględnienia wyżej wymienionych zjawisk przy prowadzeniu procesu bioreaktorowego, jego ilościowym opisie oraz przy próbach sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych.

4.1. Reologia zawiesin mikroorganizmów strzępkowych

Lepkość jest najważniejszym parametrem wpływającym na przepływ płynu (cieczy) i ma ogromne znaczenie podczas procesów przenoszenia pędu, ciepła i masy. W rozważanym przypadku bioreaktora z zawiesiną mikroorganizmów strzępkowych istotne jest mieszanie oraz napowietrzanie podłoża hodowlanego. Z tego względu lepkość odgrywa kluczową rolę w procesie bioreaktorowym.

Lepkość płynu określa się przez stosunek gradientu prędkości przepływu w płynie do siły ścinającej wywołującej ten przepływ. Zależność ta jest opisana prawem lepkości Newtona:

$$\tau = \mu_L \cdot \frac{dv}{dy} \quad (4.1)$$

gdzie: τ – jest naprężeniem ścinającym, będącym stosunkiem siły ścinającej do powierzchni (Pa lub $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$), dv/dy – gradientem prędkości, czyli szybkością ścinania $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) zaś μ_L – współczynnikiem proporcjonalności, będącym dynamiczną lepkością płynu (Pa s).

Wszystkie płyny, które spełniają prawo Newtona, to znaczy takie, w których lepkość jest niezależna od gradientu prędkości nazywamy płynami niutonowskimi.

Jednakże wiele roztworów związków wielkocząsteczkowych (naturalnych i syntetycznych polimerów) oraz zawiesin, w tym zawiesin mikroorganizmów, nie spełnia tego prawa i nazywamy je wtedy płynami nieniutonowskimi. Dziedzinę inżynierii chemicznej, która szczególnie skupia się na badaniu takich płynów nazywamy reologią.

Znane są różne płyny nieniutonowskie, a ich klasyfikacja opiera się o określenie zależności pomiędzy naprężeniem ścinającym a szybkością ścinania. Taką zależność nazywamy krzywą płynięcia. Najczęściej spotykanymi przy badaniach nad hodowlą mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach typami cieczy nieniutonowskich są tak zwane płyny potęgowe spełniające prawo Ostwalda-de Waele:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4.2)$$

gdzie: K jest konsystencją płynu ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{n-2}$) zaś n – wskaźnikiem płynięcia.

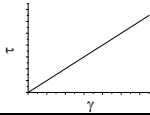
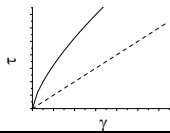
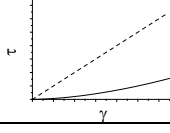
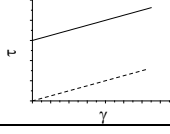
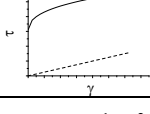
Do płynów potęgowych należą ciecze pseudoplastyczne (rozrzedzane ścinaniem) dla $n < 1$ oraz dylatancyjne (zagęszczane ścinaniem) dla $n > 1$. Znane są także płyny z granicą płynięcia, jak płyn Bingham czy Cassona. Dla płynów nieniutonowskich na podstawie zależności między naprężeniem ścinającym a szybkością ścinania określa się lepkość pozorną μ_a . W tabeli 4.1 przedstawiono klasyfikację płynów pod względem ich właściwości reologicznych.

Podczas hodowli mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach uwzględnienie właściwości reologicznych zawiesin jest bardzo istotne, szczególnie że zależą one od uzyskanej formy morfologicznej mikroorganizmu strzępkowego, a w procesach bioreaktorowych z udziałem mikroorganizmów strzępkowych na zmiany omówionych powyżej właściwości reologicznych zawiesin mają znaczący wpływ:

- stężenie biomasy,
- morfologia komórek, a przede wszystkim ich wielkość, kształt i masa,
- elastyczność komórek i skłonność do ich deformacji,
- ciśnienie osmotyczne cieczy, w której komórki są zawieszone,
- stężenie substratu polimerowego, na przykład skrobi,
- stężenie produktu polimerowego,
- szybkość ścinania.

Spośród tych czynników, w przypadku wglębnych hodowli mikroorganizmów strzępkowych, szczególne znaczenie ma morfologia mikroorganizmu oraz stężenie biomasy. Rozproszone strzępki tworzą pewną strukturę płynu, w wyniku czego taka zawiesina staje się pseudoplastyczna (rozrzedzana ścinaniem), a czasem nawet występuje granica płynięcia. Wzrost stężenia biomasy, wyrażonej jako stężenie suchej masy, w takiej zawieszynie jeszcze zwiększa nieniutonowskie właściwości takiego płynu.

Tabela 4.1. Wybrane modele reologiczne płynów stosowane do opisu zawiesin mikroorganizmów strzępkowych

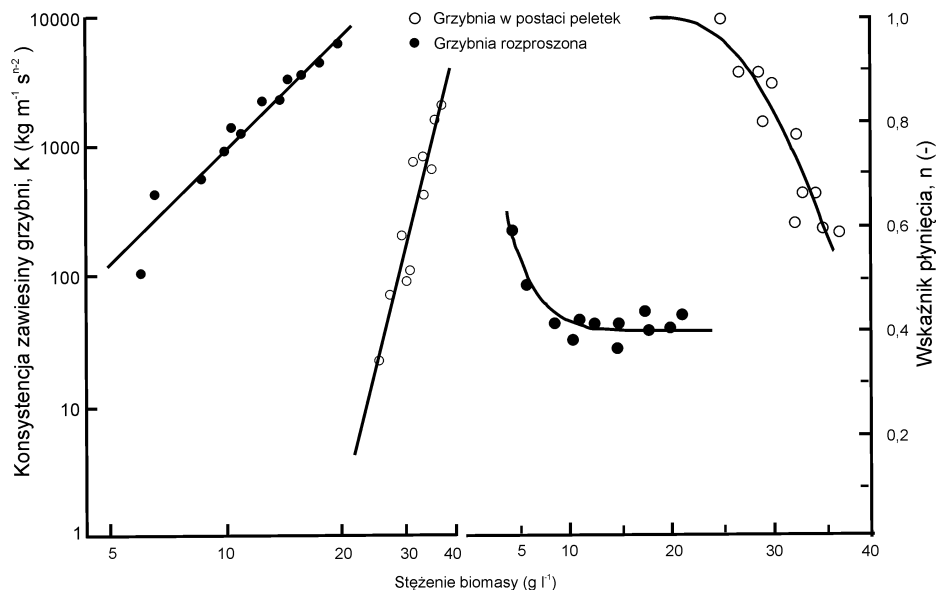
Rodzaj płynu	Model reologiczny*	Krzywa płynięcia	Lepkość pozorna
niutonowski	$\tau = \mu_L \cdot \dot{\gamma}$		$\mu_a = \mu_L$
Płyny nieniutonowskie bez granicy płynięcia			
płyn potęgowy (rozrzedzany ścinaniem)	$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ $n < 1$		$\mu_a = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$
płyn potęgowy (zagęszczany ścinaniem)	$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ $n > 1$		$\mu_a = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$
Płyny nieniutonowskie z granicą płynięcia			
płyn Binghama	$\tau = \tau_0 + K_p \cdot \dot{\gamma}$		$\mu_a = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K_p$
płyn Cassona	$\frac{1}{\tau^2} = \frac{1}{\tau_0^2} + K_p \cdot \frac{1}{\dot{\gamma}^2}$		$\mu_a = \left[\left(\frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} \right)^{\frac{1}{2}} + K_p \right]^2$

* objaśnienie symboli: τ – naprężenie ścinające ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$); $\dot{\gamma}$ – szybkość ścinania (s^{-1}); μ_L – lepkość (Pa s); μ_a lepkość pozorna (Pa s^n); K , K_p – konsystencja płynu ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{n-2}$); n – wskaźnik płynięcia

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Z drugiej strony podłoża hodowlane zawierające głównie peletki częściej zachowują się w przybliżeniu jak płyny niutonowskie, chociaż zależy to także od tego, do jakiego stopnia są deformowane peletki w czasie przepływu, czyli od ich struktury. Peletki tworzone przez grzyby strzępkowe mogą być całkiem twarde i nieodkształcalne, albo wręcz przeciwnie, miękkie i łatwo deformowalne. Na przykład u *Aspergillus terreus* ATCC 20542 zależy to od zastosowanego źródła węgla przy zachowaniu identycznego składu podłoża dla pozostałych składników. Peletki uzyskane podczas wzrostu na glukozie są mniejsze i twardsze, zaś te na glicerolu większe, bardzo elastyczne i ulegające łatwo zniszczeniu. Peletki uzyskiwane na laktozie są umiarkowanie elastyczne. Znaczenie ma również wielkość peletek w danej zawieszynie oraz ich liczba. Również stopień rozgałęzienia strzępek silnie wpływa na właściwości reologiczne. Mikroorganizmy strzępkowe o morfologii rozproszony, charakteryzujące się dużą częstotliwością rozgałęziania, są zazwyczaj mniej elastyczne niż te słabiej rozgałęzione. Tworzą one zawiesziny o wyższej lepkości niutonowskiej bądź nieniutonowskiej.

Na rys. 4.1 przedstawiono zależność między stężeniem biomasy a parametrami równania Ostwalda-de Waele (płyn potęgowy) dla grzyba strzępkowego *Absidia corymbifera* (Kim *et al.*, 1983). Widać wyraźnie zależność, że grzybnia rozproszona ma wyższą konsystencję rosnącą wraz ze stężeniem biomasy, co przekłada się na wzrost lepkości pozornej takiej zawiesiny.



Rys. 4.1. Wpływ formy morfologicznej grzybni *Absidia corymbifera* na właściwości reologiczne zawiesiny

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Kim *et al.* (1983).

Również wskaźnik płynięcia poniżej 0,5 wskazuje na silne właściwości pseudoplastyczne takich zawiesin grzybni. Przy grzybni w postaci peletek dopiero przy dużym wzroście stężenia biomasy zawiesina staje się silnie nieniu-tonowska. Innym przykładem zmiennych właściwości reologicznych zawiesin grzybów strzępkowych jest zawiesina *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Wykazuje ona zmienne właściwości silnie nieniu-tonowskie (Casas Lopez *et al.*, 2005). Przy większych peletkach (o średnicy 2000-2500 μm) wskaźnik płynięcia spada nawet do poziomu 0,4, zaś kiedy peletki są bardzo drobne (500-1000 μm) dzięki zastosowaniu wysokiej na poziomie 600 min^{-1} prędkości obrotowej mieszadła (są to nadal peletki, a nie grzybnia rozproszona), wartości wskaźnika płynięcia przekraczają 1 (do 1,5), co wskazuje na tworzenie się płynu dylatacyjnego.

Podsumowując, wielość czynników wpływających na właściwości reologiczne zawiesin mikroorganizmów strzępkowych sprawia, że w różnych układach bioreaktorowych spotyka się odmienne zachowanie płynu. Inne przykłady zmiennych właściwości reologicznych zawiesin mikroorganizmów strzępkowych przedstawia skrótowo tabela 4.2.

Tabela 4.2. Wybrane przykłady zmienności właściwości reologicznych zawiesin mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach wglębnych

Zawiesina mikroorganizmu	Literatura	Właściwości zawiesiny
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Deindoerfer i Gaden (1955)	Płyn Bingham
<i>Streptomyces noursei</i>	Deindoerfer i West (1960)	Płyn niutonowski o lepkości 0,04 Pa s
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tuffile i Pinho (1970)	W hodowli początkowo płyn Bingham (skrobia w podłożu), dalej płyn niutonowski po hydrolizie skrobi, stający się coraz silniej pseudoplastyczny wraz ze wzrostem biomasy
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Roels <i>et al.</i> (1974)	Płyn Cassona
<i>Aspergillus niger</i>	Mitard i Riba (1986)	Od płynu niutonowskiego przez pseudoplastyczny do płynu Bingham zależnie od liczby peletek znajdującej się w płynie pohodowlanym
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ju <i>et al.</i> (1991)	Płyn pseudoplastyczny
<i>Aspergillus niger</i>	Berovič <i>et al.</i> (1991)	Płyn niutonowski do momentu uformowania się peletek (niskie stężenie biomasy), następnie pseudoplastyczny peletki (znaczny wzrost stężenia biomasy)
<i>Aspergillus niger</i>	Berkman-Dik <i>et al.</i> (1992)	Płyn pseudoplastyczny (odfiltrowana biomasa zawieszona w wodzie)
<i>Aspergillus terreus</i>	Casas Lopez <i>et al.</i> (2005)	Dylatancyjny (małe peletki) lub pseudoplastyczny (większe peletki)
<i>Aspergillus niger</i> (inulinolityczny)	badania własne	Płyn silnie pseudoplastyczny (n = 0,2) morfologia rozproszona

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Na koniec należy wyraźnie stwierdzić, jakie są konsekwencje wynikające ze zmiennych właściwości reologicznych i zmiennej lepkości zawiesin mikroorganizmów strzępkowych. Otóż pojawiają się problemy z mieszaniem zawiesiny mikroorganizmów strzępkowych, co prowadzi do mniejszej skuteczności napowietrzania fazy ciekłej i może następnie utrudniać dostęp tlenu do wszystkich komórek mikroorganizmów. Tym zagadnieniom zostaną poświęcone dwa kolejne rozdziały.

4.2. Mieszanie zawiesin mikroorganizmów strzępkowych

Mieszanie jest operacją mechaniczną, której celem jest zmniejszenie niejednorodności w mieszanym płynie, eliminacja gradientów stężeń, temperatury oraz ujednolicenie innych właściwości fizykochemicznych. Mieszanie polega na przesuwaniu porcji materiału mieszanego (np. zawiesiny mikroorganizmów strzępkowych) w różne miejsca przez działanie siły mechanicznej wytwarzanej przez mieszadło. W inżynierii bioreaktorowej w wielu obliczeniach modelowych oraz podczas wykonywania bilansu bioreaktorów (tych mieszadłowych, jak i bezmieszadłowych mieszanych przepływającą fazą gazową) przyjmuje się założenie idealnego wymieszania, to znaczy takiego, że w opisywanej objętości zawiesiny nie występują żadne gradienty stężeń i temperatury.

Celem mieszania podłoża hodowlanych oraz zawiesin mikroorganizmów (w tym mikroorganizmów strzępkowych) w bioreaktorach w czasie trwania procesu jest:

- rozpraszanie pęcherzyków powietrza w celu ich równomiernej dystrybucji i zapewnienia odpowiedniego poziomu nasycenia tlenem podłoża (intensyfikacja transportu masy w bioreaktorze),
- utrzymanie mikroorganizmów w stanie zawiesiny,
- intensyfikacja transportu ciepła w bioreaktorze.

Mieszanie również jest niezbędne przy rozpuszczaniu składników podłoża przed inokulacją oraz, gdy taka sytuacja ma miejsce, przy emulgowaniu cieczy nie mieszających się z wodą.

Z tego względu, że poprzez mieszanie dostarczamy energię potrzebną do ujednoldnienia mieszanego płynu, podstawowym parametrem charakteryzującym proces mieszania jest moc mieszania. Moc mieszania zależy od wielu czynników, do których należą wielkość mieszalnika (zbiornika) i mieszadła oraz ich geometryczne ustawienie, a także właściwości fizykochemiczne mieszanego płynu. Najlepiej w inżynierii chemicznej poznany jest przypadek mieszania płynów niutonowskich bez wprowadzania gazu do mieszanej cieczy. Choć prawie nigdy taka sytuacja nie występuje podczas mieszania zawartości bioreaktorów, od uproszczonego opisu tego procesu (więcej szczegółów można znaleźć w podręcznikach inżynierii chemicznej) zostaną rozpoczęte niniejsze rozważania.

Do obliczania mocy mieszania stosuje się równanie kryterialne złożone z liczb bezwymiarowych: liczby mocy mieszania (Eulera), liczby Reynoldsa dla procesu mieszania, liczby Froude'a oraz simpleksów geometrycznych (zależności między średnicą mieszadła, mieszalnika, odległością mieszadła od dna mieszalnika oraz wysokością łopatek mieszadła):

$$Eu = \frac{P}{\rho_L \cdot n_i^3 \cdot d_i^5} \quad (4.3)$$

$$Re_i = \frac{n_i \cdot d_i^2 \cdot \rho_L}{\mu_L} \quad (4.4)$$

$$Fr = \frac{n_i^2 \cdot d_i}{g} \quad (4.5)$$

gdzie: P – moc mieszania (W), ρ_L – gęstość mieszanego płynu (kg m^{-3}), n_i – prędkość obrotowa mieszadła (s^{-1}), d_i – średnica mieszadła (m), μ_L – lepkość dynamiczna mieszanego płynu oraz g – stała grawitacji ziemskiej (m s^{-2}). Równanie kryterialne dla konkretnego przypadku geometrii układu przyjmuje najczęściej postać funkcji:

$$\frac{Eu}{Fr} = f(Re_i) \quad (4.6)$$

Często dla uproszczenia przyjmuje się wartość liczby Froude’a równą 1 (rys. 4.2).

Na rys. 4.2 wyróżnione są trzy zakresy mieszania: laminarny, przejściowy i burzliwy (turbulentny). Dla obszaru laminarnego moc mieszania zależy w znacznej mierze od lepkości mieszanej zawiesiny, ponieważ zależność między liczbą Eu i Re_i jest odwrotnie proporcjonalna (liniowa malejąca w układzie dwulogarytmicznym):

$$Eu \propto \frac{1}{Re_i} \quad (4.7)$$

Zatem, korzystając z równania (4.3) i (4.4), uzyskujemy zależność:

$$P = k_1 \cdot \mu_L \cdot n_i^2 \cdot d_i^3 \quad (4.8)$$

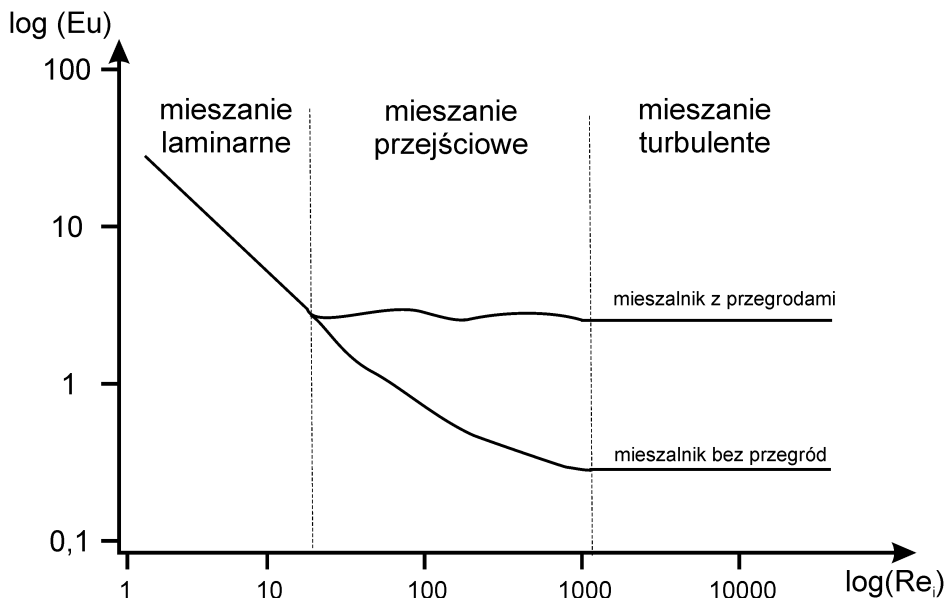
gdzie: k_1 jest stałą.

W pełni rozwiniętym zakresie burzliwym liczba mocy mieszania Eu jest stała i nie zależy od liczby Reynoldsa. Zatem moc mieszania wyznaczona z równania (4.3) wynosi:

$$P = Eu \cdot \rho_L \cdot n_i^3 \cdot d_i^5 \quad (4.9)$$

W tym przypadku moc mieszania jest wprost proporcjonalna do gęstości mieszanego płynu. W obszarze burzliwym wartość liczby Eulera (i moc mieszania) zależy jeszcze od tego, czy w mieszalniku są zainstalowane przegrody zwiększające burzliwość mieszania i jednocześnie moc mieszania (rys. 4.2). We wszystkich zakresach moc mieszania zależy również od średnicy mieszadła oraz jego

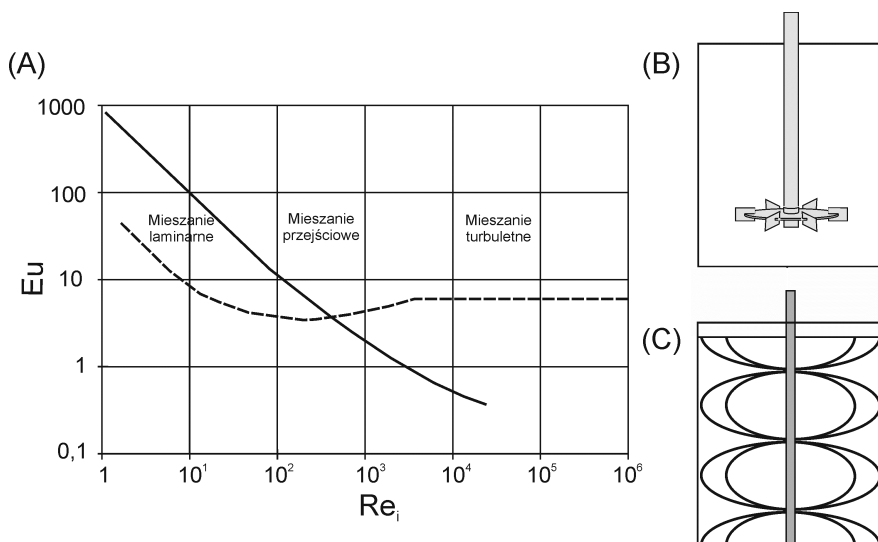
prędkości obrotowej z tym, że w obszarze burzliwym zależność ta jest silniejsza (wyższe potęgi przy tych zmiennych).



Rys. 4.2. Zależność pomiędzy liczbą mocy mieszania (Eulera) a liczbą Reynoldsa dla procesu mieszania

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Aby zapewnić efektywne mieszanie, istotny jest dobór właściwego mieszadła. W bioreaktorach dominują mieszadła turbinowo-tarczowe Rushtona (stosunek średnicy mieszadła do mieszalnika wynosi 3). Mieszanie za ich pomocą jest bardzo sprawne i zapewnia przede wszystkim dobrą dystrybucję pęcherzyków powietrza w bioreaktorze. Najlepiej sprawdzają się one do płynów niutonowskich o lepkości nie przekraczającej 50 Pa s (Holland i Chapman, 1966). Dla bardziej lepkich zawiesin zalecane jest zastosowanie mieszadeł śrubowych i wstęgowych o dużej średnicy porównywalnej ze średnicą mieszalnika (np. stosunek średnicy mieszalnika do mieszadła wynosi 1,02). Na rys. 4.3 zostały przedstawione przykładowe mieszadła stosowane w bioreaktorach wraz z ich charakterystykami mieszania. Należy tu zwrócić uwagę, że dla mieszadła wstęgowego mieszanie odbywa się praktycznie w obszarze laminarnym i przejściowym. Z punktu widzenia mieszania zawiesin mikroorganizmów strzępkowych jest szczególnie istotne, w którym obszarze się znajdujemy, bo może pojawić się sytuacja, że ze względu na wysoką lepkość mieszanego płynu (zawiesiny mikroorganizmów strzępkowych) zakres w pełni rozwiniętego mieszania burzliwego jest nieosiągalny. Trzeba się wtedy liczyć ze zwiększonym zapotrzebowaniem na moc podczas mieszania. Dodajmy jeszcze, że rozważamy tu na razie tylko płyny niutonowskie, nieczęsto występujące w bioreaktorach z hodowlami mikroorganizmów strzępkowych.



Rys. 4.3. Charakterystyki mieszadeł często stosowanych w bioreaktorach do hodowli mikroorganizmów, w tym mikroorganizmów strzępkowych (A); linia przerywana: mieszadło turbinowo-tarczowe Rushtona (B), linia ciągła mieszadło wstęgowe (C)

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Doran (2004).

Jeżeli mamy do czynienia z płynami nieniutonowskimi w bioreaktorze, to ich mieszanie istotnie się komplikuje, gdyż trzeba uwzględnić lepkość pozorną w wyrażeniu na liczbę Reynoldsa. Najczęściej stosowanym modelem reologicznym płynu dla zawiesin mikroorganizmów strzępkowych, o czym była mowa w rozdziale 4.1, jest płyn potęgowy Ostwalda-de Waele. Wtedy liczba Reynoldsa przyjmuje postać:

$$Re_i = \frac{n_i \cdot d_i^2 \cdot \rho}{\mu_a}, \quad (4.10)$$

gdzie pozorna lepkość płynu dla płynu potęgowego wynosi:

$$\mu_a = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (4.11)$$

i jest zależna od szybkości ścinania $\dot{\gamma}$ oraz parametrów modelu reologicznego płynu K i n .

Przy mieszaniu płynów potęgowych rozrzedzanych ścinaniem, którymi są najczęściej zawiesiny grzybów strzępkowych i promieniowców rosnących w formie morfologii rozproszonej, trzeba jeszcze pamiętać o jednej sprawie. Wiadomo, że lepkość pozorna takiego płynu zależy od szybkości ścinania (równanie 4.11), a w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym rozkład szybkości ścinania jest zdecydowanie niejednorodny i zależy od odległości od mieszadła. Największe szybkości ścinania występują w bezpośrednim sąsiedztwie miesza-

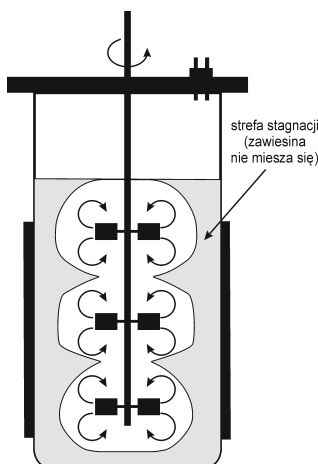
dła. Według danych Metznera i Taylora (1960) przy prędkości obrotowej mieszadła o średnicy około 10 cm na poziomie 200 min^{-1} w odległości ok. 2,5 cm od końcówki mieszadła szybkość ścinania jest na poziomie około 10 s^{-1} zaś dziesięciokrotnie bliżej końcówki mieszadła szybkość ta rośnie do powyżej 240 s^{-1} . W efekcie pseudoplastyczna zawieszina ma niską lepkość i dobrze burzliwie się miesza w bezpośrednim sąsiedztwie mieszadła. Ale im dalej od mieszadła w kierunku ścianki bioreaktora, tym szybkość ścinania maleje i płyn staje się bardzo lepki. Dochodzi wtedy do takiej sytuacji jak na rys. 4.4. Pojawiają się strefy stagnacji, w których płyn bardzo słabo się porusza bądź nie porusza się wcale.

Metzner i Otto (1957) zaproponowali prostą linową zależność łączącą średnią szybkość ścinania γ_{av} i prędkość obrotową mieszadła n_i :

$$\gamma_{av} = k \cdot n_i \quad (4.12)$$

gdzie: k jest stałą zależną od rodzaju i wielkości mieszadła. Zależność ta dobrze opisuje dane eksperymentalne, ale trzeba pamiętać, że występuje w niej średnia szybkość ścinania w zbiorniku, a lokalne szybkości ścinania mogą być znacznie mniejsze lub większe od niej, o czym była mowa powyżej.

Pseudoplastyczne właściwości mieszanej zawiesziny prowadzą do niewłaściwego jej wymieszania i niespełnienia zasady idealnego wymieszania w takim bioreaktorze. Jednym sposobem uniknięcia sytuacji lokalnego rozrzedzania ścinaniem mieszanej zawiesziny jest zmiana geometrii mieszadła. Potrzebne są mieszadła większej średnicy jak na przykład mieszadła kotwicowe czy mieszadła wstęgowe (trzeba tylko pamiętać, że te ostatnie mają gorsze właściwości napowietrzające), a stosunek średnicy mieszalnika do mieszadła dla płynów niutonowskich na poziomie 3 musi być zmniejszony do 1,6-2.



Rys. 4.4. Mieszanie nieniutonowskiego płynu potęgowego pseudoplastycznego, czyli rozrzedzanego ścinaniem

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Doran (2004).

Powyższe rozważania dotyczące cieczy, do których nie jest doprowadzana faza gazowa, należy jeszcze uzupełnić o sytuację, kiedy napowietrzamy zawiesinę w mieszalniku (bioreaktorze). Dzięki wprowadzeniu gazu ulega zmniejszeniu zapotrzebowanie na moc podczas mieszania. Wynika to z obniżenia gęstości mieszanego układu dzięki pęcherzykom gazu. Co więcej, zmienia się zachowanie hydrodynamiczne cieczy wokół mieszadła. Tworzą się duże przestrzenie wypełnione gazem za łopatkami mieszadła, zmniejszając opory ruchu płynu. Jednakże przypadkowość dyspersji gazów w mieszanych cieczach powoduje, że trudno jest uzyskać konkretne zależności, aby przewidzieć zapotrzebowanie na moc mieszania. Istnieje jednak zależność eksperymentalna podana przez Hughmarka (1980):

$$\frac{P_G}{P} = 0.10 \cdot \left(\frac{F_G}{n_i \cdot V} \right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{n_i^2 \cdot d_i^4}{g \cdot w_i \cdot V^{\frac{2}{3}}} \right)^{-0.20} \quad (4.13)$$

gdzie: P_G i P są mocami mieszania odpowiednio cieczy napowietrzanej i nienapowietrzanej (W), F_G – objętościowym natężeniem przepływu powietrza ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), n_i – prędkością obrotową mieszadła (s^{-1}), V – objętością cieczy w zbiorniku (m^3), d_i – średnicą mieszadła (m), w_i – szerokością łopatki mieszadła (m), a g – przyspieszeniem ziemskim (m s^{-2}).

Wysoka lepkość niutonowska lub nieniutonowska zawiesin mikroorganizmów strzępkowych hodowanych w bioreaktorach każe jeszcze zwrócić szczególną uwagę na efektywność procesu mieszania, wyrażaną parametrem zwanym czasem mieszania. Czas mieszania t_m jest to czas wymagany do osiągnięcia odpowiedniego stopnia homogeniczności począwszy od stanu zupełnego braku homogeniczności. Mierzy się ją zazwyczaj przez wprowadzenie znacznika do zbiornika i pomiarze jego stężenia w konkretnym punkcie zbiornika. Zwykle są to kwasy, zasady czy też inne substancje, których obecność łatwo jest wykrywać przez wykorzystanie standardowych czujników używanych w bioreaktorach, jak np. czujnik pH. Po wprowadzeniu znacznika do zbiornika sygnał czujnika przyjmuje postać sinusoidy tłumionej, a odległość między maksimami nazywamy czasem cyrkulacji t_c . Z reguły czas mieszania to cztery czasy cyrkulacji. Najważniejsza jest jednak zależność iloczynu prędkości obrotowej mieszadła i czasu mieszania $n_i \cdot t_m$ od liczby Reynoldsa dla mieszania. Jest ona szybko malejącą funkcją Re_i w zakresie od 100 do 40000. Dla wysokich liczb Reynoldsa staje się ona stała i równa:

$$n_i \cdot t_m = \frac{1.54 \cdot V}{d_i^3} \quad (4.14)$$

gdzie: V jest objętością cieczy (m^3), a d_i – średnicą mieszadła (m).

Czas mieszania dla bioreaktorów przemysłowych o objętości rzędu metrów sześciennych mieści się w zakresie od 30 do 120 s, o ile mieszana zawiesina jest

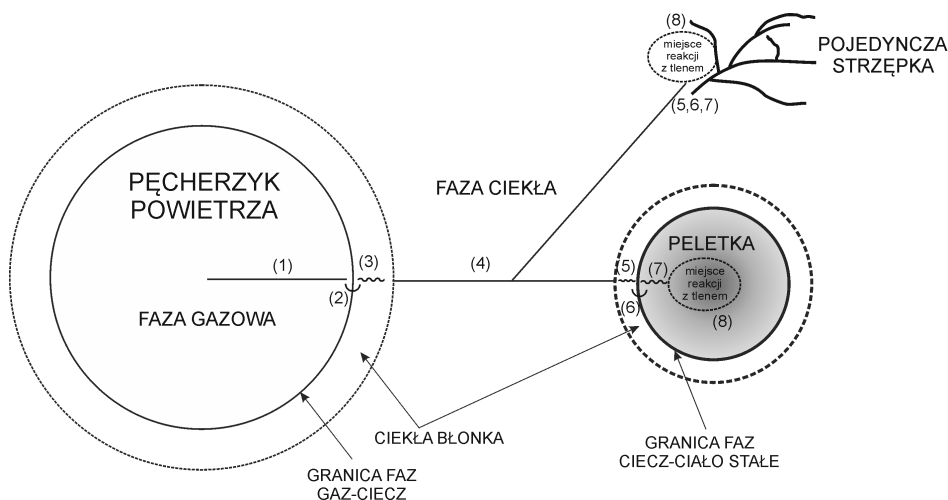
niezbyt lepka i niutonowska. Idealna sytuacja jest wtedy, gdy czas mieszania jest możliwie najkrótszy. W przypadku zawiesin mikroorganizmów strzępkowych czas mieszania bardziej zależy od liczby Reynoldsa, a więc od lepkości i gęstości zawiesiny. Może się on znacząco wydłużyć nawet do rzędu wielu minut, jeżeli mamy do czynienia z wysokolepką zawiesiną, co gorsza, o właściwościach pseudoplastycznych.

Podsumowując, morfologia grzybni oraz mieszanie są powiązane ze sobą wzajemnymi zależnościami. Z jednej strony stężenie i forma biomasy mikroorganizmów strzępkowych silnie wpływa na właściwości reologiczne zawiesiny przez co i na proces mieszania. Z drugiej zaś strony naprężenia mechaniczne związane z procesem mieszania wywołują tworzenie się takiej, a nie innej formy morfologicznej, zazwyczaj poprzez fragmentację strzępek. Ten efekt jest związany z trójetapowym mechanizmem procesu mieszania. Ze względu na to, że intensywność mieszania może być czynnikiem służącym kontrolowaniu morfologii grzybni, to oddziaływanie procesu mieszania na morfologię grzybni przez naprężenia mechaniczne zostanie omówione w rozdziale 5.1.3.

4.3. Napowietrzanie bioreaktorów: konwekcja i dyfuzja tlenu w bioreaktorze

Zawiesina mikroorganizmów w bioreaktorze jest układem trójfazowym. W fazie ciekłej, której dominującym składnikiem jest woda, zawieszone są różnej wielkości komórki mikroorganizmów, stanowiące fazę stałą. W przypadku mikroorganizmów strzępkowych, jak promieniowce i grzyby strzępkowe zakres tych wielkości jest dość duży zależnie od tego, czy mamy do czynienia z morfologią rozproszoną, czy zwartą (peletki). Zawiesina ta zawsze jest napowietrzana, bo grzyby strzępkowe i promieniowce są organizmami tlenowymi. Powietrze jest wprowadzane do bioreaktora w postaci drobnych pęcherzyków poprzez perforowaną rurkę zwaną bełkotką. Zatem w powiązaniu z morfologią mikroorganizmów strzępkowych wyłania się zagadnienie transportu tlenu od pęcherzyka powietrza do miejsca reakcji biochemicznej z udziałem tlenu w żywej komórce. Na rys. 4.5 przedstawiono schematycznie wszystkie etapy transportu tlenu w bioreaktorze.

Podczas ilościowej analizy przenoszenia masy zawsze ważne jest, aby określić etap najwolniejszy. Cały proces jest tak szybki, jak szybki jest najwolniejszy z jego etapów, zwany etapem limitującym. Etapy (1) i (2) nigdy w bioreaktorach nie są limitujące. W pęcherzyku powietrza faza gazowa porusza się ruchem turbulentnym i nie występują żadne gradienty stężeń tlenu. Również przenoszenie masy (tlenu) przez granicę faz gaz-ciecz jest Nielimitujące ze względu na to, że grubość granicy faz jest bardzo mała. Trzeci etap, czyli transport tlenu w ciekłej błoncie jest zawsze etapem limitującym szybkość całego procesu przenoszenia tlenu w bioreaktorze, jeżeli mikroorganizmy nie tworzą żadnych aglomeratów.



Rys. 4.5. Etapy transportu tlenu w bioreaktorze od pęcherzyka powietrza do mikroorganizmu strzępkowego (peletka lub wolne strzępki): (1) konwekcja wewnątrz pęcherzyka powietrza (warunki przepływu turbulentne), (2) dyfuzja przez granicę faz gaz-ciecz, (3) konwekcja w cieklej błonce (warunki przepływu laminarne), (4) konwekcja w fazie cieklej (warunki przepływu turbulentne), (5) konwekcja przez cieklą błonkę otaczającą komórki mikroorganizmu (strzępki) lub ich aglomeraty (peletki), (6) dyfuzja przez granicę faz ciecz-ciało stałe; (7) dyfuzja wewnątrz peletek lub strzępek, (8) miejsce reakcji biologicznej

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Doran (2004).

Napowietrzanie podłoża hodowlanego w bioreaktorze to z punktu widzenia procesów jednostkowych inżynierii chemicznej absorpcja gazu w cieczy. Najczęściej opisuje się ten proces modelem dwubłonkowym Whitmanna. Ponieważ tlen należy do gazów źle rozpuszczalnych w wodzie, opory ruchu masy występują po stronie fazy cieklej. Dlatego współczynnik przenikania tlenu od fazy gazowej do fazy cieklej, będący miarą ilościową procesu, można z dobrym przybliżeniem zastąpić iloczynem współczynnika wnikania masy k_L po stronie fazy cieklej i powierzchni właściwej wymiany masy a , czyli $k_L a$. Dokładniej, k_L jest współczynnikiem wnikania masy wyrażonym najczęściej w m s^{-1} , zaś a jest właściwą powierzchnią wymiany masy $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$. Zatem strumień tlenu doprowadzonego do fazy cieklej bioreaktora jest określany jako OTR (*oxygen transfer rate*), jest opisany równaniem:

$$OTR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (4.15)$$

gdzie: $c_{O_2}^*$ jest maksymalnym stężeniem tlenu w podłożu w danych warunkach ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ lub $\text{g O}_2 \text{ m}^{-3}$) zaś c_{O_2} jest aktualnym stężeniem tlenu w podłożu ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ lub $\text{g O}_2 \text{ m}^{-3}$).

Aby właściwie napowietrzyć bioreaktor, czyli żeby zapewnić co najmniej niezerowe bądź zadane na określonym poziomie stężenie tlenu w podłożu hodowlanym, szybkość transportu tlenu OTR musi być wyższa od szybkości pobierania tlenu OUR (*oxygen uptake rate*) przez mikroorganizm zgodnie z bilansem tlenu w bioreaktorze o działaniu okresowym:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad (4.16)$$

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{1}{Y_{XO}} \cdot \mu \cdot c_X \quad (4.17)$$

gdzie: Y_{XO} jest współczynnikiem wydajności biomasy na tlenie (g X g O_2^{-1}), μ – jest właściwą szybkością wzrostu biomasy (h^{-1}), zaś c_X stężeniem biomasy (g X l^{-1}) w bioreaktorze.

Wyznaczanie współczynnika wnikania masy dla tlenu k_L oraz właściwej powierzchni wymiany masy a nie jest łatwe. Właściwa powierzchnia wymiany masy może być określana na podstawie zatrzymania gazu w cieczy (*hold-up*), będącego stosunkiem objętości fazy gazowej w bioreaktorze do sumy objętości obu faz: ciekłej i gazowej. Natomiast k_L występuje w równaniach kryterialnych łączących liczby Sherwooda, Reynoldsa i Schmidta i przez to zależy od parametrów fizykochemicznych płynu, warunków hydrodynamicznych oraz współczynnika dyfuzji w cieczy. Z tego względu rzadko wyznacza się te wielkości osobno. W inżynierii bioreaktorowej stosuje się wyznaczenie iloczynu $k_L a$, czyli ilościowej miary konwekcyjnego transportu tlenu od pęcherzyka powietrza do podłoża hodowlanego. Wyznaczenie $k_L a$ dokonuje się najczęściej metodą dynamiczną z wykorzystaniem równań bilansu tlenu w bioreaktorze (4.16) i (4.17). W czasie hodowli odcina się dopływ powietrza, zerując OTR, i wyznacza wartość OUR (nachylenie linowego spadku nasycenia tlenem podłoża wskutek braku napowietrzania). Po przywróceniu dopływu powietrza następuje krzywoliniowy wzrost nasycenia tlenem podłoża odpowiadający wzajemnemu stosunkowi wartości OUR i OTR.

Znajomość wartości $k_L a$ w danej hodowli jest istotna. Od niej zależy, czy jest możliwe dostarczenie odpowiedniej ilości tlenu wymaganej przez dany mikroorganizm. Jednocześnie wiele czynników wpływa na wartość współczynnika $k_L a$. Są to parametry fizykochemiczne płynu oraz sterowalne parametry procesowe, jak szybkość napowietrzania (v_{vm} , $\text{l}_{\text{pow}} \text{l}^{-1} \text{min}^{-1}$) i prędkość obrotowa mieszadła. Do tych czynników jeszcze oczywiście należy morfologia danego mikroorganizmu strzępkowego, ale niebezpośrednio, lecz przede wszystkim poprzez właściwości reologiczne zawiesiny, o których była mowa w rozdziale 4.1. Wzrost grzybni w formie rozproszonej prowadzi do znaczącego pogorszenia warunków wnikania tlenu i spadku wartości $k_L a$ ze względu na znaczny przyrost lepkości zawiesiny, jej nieniutonowskie właściwości i pogorszenie efektywności mieszania zawiesiny w bioreaktorze. Stąd przy wysokich lepkościach można, a nawet należy, zwiększać szybkość napowietrzania oraz intensywność mieszania (prędkość obrotowa mieszadła). Nie ma jednak gwarancji,

że zostanie uzyskany pożądany efekt przy dużych stężeniach rozproszonej biomasy grzybni.

Kolejne etapy transportu tlenu przedstawione na rys. 4.5 nie są etapami limitującymi, o ile mamy do czynienia z grzybnią o morfologii rozproszonej, a mieszanie w bioreaktorze przebiega bez zakłóceń. Wtedy fazy ciekła i stała (zawiesina) są w bioreaktorze idealnie wymieszane (etap 4), wielkość (grubość) pojedynczych strzępek grzybni, a przez to grubość błonki ciekłej je otaczającej (etap 5), jest bardzo mała, pokonanie przez tlen granicy ciecz ciało stałe (etap 6) nie stanowi problemu, zaś dyfuzja tlenu (etap 7) w ciele stałym (strzępka) do miejsca reakcji (etap 8) jest natychmiastowa ze względu na rozmiar strzępki (kilka mikrometrów).

Inaczej przedstawia się sprawa transportu masy na etapach od 3 do 8, jeżeli mamy do czynienia z morfologią zwartą, czyli wtedy, gdy grzybnia rośnie w postaci peletek o wielkości od kilkuset mikrometrów do kilku milimetrów. W tej sytuacji lepkość podłoża nie rośnie tak szybko, a zawiesina może mieć właściwości niutonowskie lub słabo nieniuonowskie. Etap 4 oraz etap 6 nie różni się od poprzedniego przypadku (rys. 4.5), ale nie można jednoznacznie powiedzieć, czy transport tlenu na etapie 3 jest rzeczywiście etapem limitującym. W przypadku takich makroskopowych skupisk biomasy, jak peletki, mogą się pojawić opory ruchu masy w błonce ciekłej otaczającej peletkę (etap 5). Wyrażone są one ilościowo przez iloczyn współczynnika wnikania masy od fazy ciekłej do fazy stałej oraz właściwej powierzchni wnikania masy k_{sa} , w równaniu opisującym szybkość transportu tlenu do peletki OTR_p :

$$OTR_p = k_{sa} \cdot (c_{O_2} - c_{O_2}^{(S)}) \quad (4.18)$$

gdzie: c_{O_2} – aktualne stężenie tlenu w zawieszynie ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ lub $\text{g O}_2 \text{ m}^{-3}$), $c_{O_2}^{(S)}$ – stężenie tlenu na powierzchni peletki ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ lub $\text{g O}_2 \text{ m}^{-3}$).

Inaczej niż w przypadku $k_L a$, wyznaczenie współczynnika wnikania masy k_{sa} jest łatwiejsze. Przede wszystkim dobrze znana jest właściwa powierzchnia wymiany masy, gdyż bardzo łatwo można zmierzyć średnią średnicę peletki. Jeżeli mamy do czynienia z cząstkami (peletkami) znajdującymi się w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym, to współczynnik wnikania masy można wyznaczyć z poniższych równań kryterialnych (van't Riet i Tramper, 1991):

$$Sh = \sqrt{4 + 1.21 \cdot (Re_p \cdot Sc)^{0.67}} \quad \text{dla} \quad Re_p Sc < 10^4 \quad (4.19)$$

lub

$$Sh = 2 + 0.6 \cdot Re_p^{0.5} \cdot Sc^{0.33} \quad \text{dla} \quad Re_p < 10^3 \quad (4.20)$$

gdzie:

$$Re_p = \frac{D_p \cdot u_{p,L} \cdot \rho_L}{\mu_L} \quad (4.21)$$

jest liczbą Reynoldsa dla cząstki: D_p – średnica cząstki (m), $u_{p,L}$ – prędkość ruchu cząstki wobec fazy ciekłej (m s^{-1}), ρ_L i μ_L odpowiednio gęstość (kg m^{-3}) i lepkość cieczy (Pa s),

$$Sh = \frac{k_s \cdot D_p}{D_{eff}} \quad (4.22)$$

jest liczbą Sherwooda dla cząstki: D_{eff} – efektywny współczynnik dyfuzji dla cieczy ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) zaś

$$Sc = \frac{\mu_L}{\rho_L \cdot D_{eff}} \quad (4.23)$$

jest liczbą Schmidta.

Ze względu na to, że prędkość $u_{p,L}$ jest w praktyce niewyznaczalna, określa się wartość liczby Reynoldsa dla cząstki w danym układzie na podstawie liczby Grashofa (van't Riet and Tramper, 1991):

$$Gr = \frac{g \cdot D_p^3 \cdot \rho_L \cdot (\rho_p - \rho_L)}{\mu_L^2} \quad (4.24)$$

korzystając z następujących zależności:

$$Re_p = \frac{Gr}{18} \quad \text{dla} \quad Gr < 36 \quad (4.25)$$

$$Re_p = 0.153 \cdot Gr^{0.71} \quad \text{dla} \quad 36 < Gr < 8 \cdot 10^4 \quad (4.26)$$

$$Re_p = 1.74 \cdot Gr^{0.5} \quad \text{dla} \quad 8 \cdot 10^4 < Gr < 3 \cdot 10^9 \quad (4.27)$$

Najczęściej jednak do określenia tego, na ile opory ruchu masy wpływają na szybkość zużywania tlenu, najłatwiej jest się posłużyć współczynnikiem efektywności zewnętrznej definiowanej jako:

$$\eta_E = \frac{r_{O_2}^{(S)}}{r_{O_2}^{(B)}} \quad (4.28)$$

gdzie: $r_{O_2}^{(S)}$ jest szybkością zużywania tlenu, gdyby stężenie tlenu w całej peletce było równe jego stężeniu na powierzchni peletki $c_{O_2}^{(S)}$, zaś $r_{O_2}^{(B)}$ jest szybkością zużywania tlenu, gdyby jego stężenie w całej peletce było równe temu w rdzeniu cieczy $c_{O_2}^{(B)}$ oraz bezwymiarowym modulem Ω :

$$\Omega = \frac{V_P}{S_P} \cdot \frac{r_{O_2}^{obs}}{k_S \cdot c_{O_2}^{(B)}} \quad (4.29)$$

gdzie $r_{O_2}^{obs}$ jest obserwowaną szybkością zużywania tlenu ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ s}^{-1}$), zaś V_P i S_P odpowiednio objętością (m^3) i polem powierzchni (m^2) peletki. Jeśli wartość modułu Ω jest znacznie mniejsza od 1, to oznacza, że stężenia $c_{O_2}^{(B)}$ oraz $c_{O_2}^{(S)}$ są sobie równe i zewnętrzne opory ruchu masy są pomijalne.

Etap 7 (rys. 4.5) może być kolejnym etapem limitującym. Dyfuzja substratów (w tym tlenu) poprzez strukturę grzybni jest powolna ze względu na długość drogi dyfuzji. W takich przypadkach również trzeba ustalić, czy proces jest limitowany dyfuzyjnymi oporami ruchu masy w peletce (reżim dyfuzyjny), czy też wolniejsza jest reakcja biologiczna (etap 8) w samej peletce (reżim kinetyczny). Zagadnienie to polega na rozwiązaniu bilansu tlenu w stanie ustalonym dla peletki (Karel *et al.*, 1985):

$$D_{eff} \left(\frac{d^2 c_{O_2}^P}{dr^2} \cdot r^2 + 2 \cdot r \cdot \frac{dc_{O_2}^P}{dr} \right) - r_{O_2} \cdot r^2 = 0 \quad (4.30)$$

gdzie: D_{eff} – efektywny współczynnik dyfuzji ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$), r – promień peletki (m), $c_{O_2}^P$ – stężenie tlenu w peletce ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$), r_{O_2} – szybkość reakcji biologicznej zachodzącej w peletce związanej z wykorzystywaniem tlenu ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Zazwyczaj stosuje się trzy rodzaje modeli biologicznych: model Michaelisa Menten w postaci równania:

$$r_{O_2} = r_{O_2}^{\max} \cdot \frac{c_{O_2}^P}{c_{O_2}^P + K_M} \quad (4.31)$$

lub jego przybliżenia jako równanie kinetyczne rzędu zerowego

$$r_{O_2} = r_{O_2}^{\max} \quad (4.32)$$

lub rzędu pierwszego:

$$r_{O_2} = r_{O_2}^{\max} \cdot c_{O_2}^P \quad (4.33)$$

Tylko w tych dwóch ostatnich przypadkach równanie 4.30 ma rozwiązanie analityczne. Reżim procesu określa się poprzez obliczenie wartości współczynnika efektywności wewnętrznej (Bischoff, 1965):

$$\eta_I = \frac{r_{O_2}^{obs}}{r_{O_2}^{(S)}} \quad (4.34)$$

gdzie jest $r_{O_2}^{obs}$ jest obserwowaną szybkością reakcji, zaś $r_{O_2}^{(S)}$ jest maksymalną możliwą szybkością reakcji (przy stężeniu tlenu w całej peletce równym temu na jej powierzchni) oraz znalezienie wartości uogólnionego modułu Thielego (Thiele, 1939; Aris 1965), który na przykład przy przyjęciu kinetyki Michaelisa-Menten oraz sferycznego kształtu peletki oblicza się ze wzoru:

$$\phi_M = \frac{R}{3 \cdot \sqrt{2}} \cdot \sqrt{\frac{r_{O_2}^{max}}{D_{eff} \cdot c_{O_2}^S}} \cdot \left(\frac{1}{1 + \beta} \right) \cdot \left[1 + \beta \cdot \ln \left(\frac{\beta}{\beta + 1} \right) \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (4.35)$$

gdzie R jest promieniem peletki (m), a β jest stosunkiem stałej Michaelisa do stężenia substratu (tlenu) na powierzchni peletki:

$$\beta = \frac{K_M}{c_{O_2}^S} \quad (4.36)$$

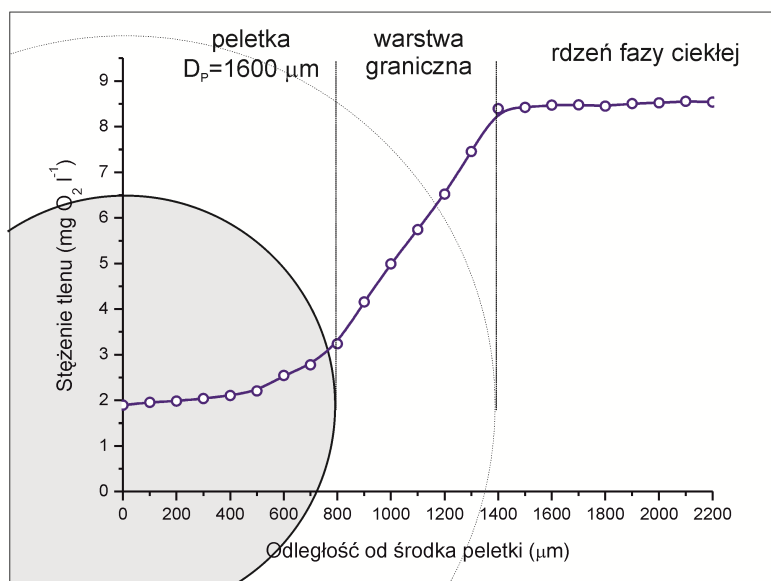
Wyznaczenie modułu Thielego wymaga jednak znajomości efektywnego współczynnika dyfuzji oraz, co jeszcze ważniejsze, przyjęcia, właściwej kinetyki reakcji biologicznej. Jeśli kinetyka reakcji biologicznej jest niemożliwa do określenia lub nietypowa lepiej jest skorzystać z obserwowalnego modułu Thielego zwanego też modułem Weisza Φ (Weisz, 1973), w którym wprowadza się, analogicznie do modułu Ω , obserwowaną szybkość reakcji $r_{O_2}^{obs}$:

$$\Phi = \left(\frac{V_P}{S_P} \right)^2 \cdot \frac{r_{O_2}^{obs}}{D_{eff} \cdot c_{O_2}^S} \quad (4.37)$$

Wartość modułu Weisza określa reżim reakcji. Zatem jeżeli $\Phi < 0,3$, to $\eta_i \approx 1$ i wewnętrzne opory ruchu masy są pomijalne. Jeżeli $\Phi > 3$, to $\eta_i \ll 1$ i wewnętrzne opory ruchu masy są znaczące. W zakresie $0,3 < \Phi < 3$ jest wymagana szczegółowa analiza, aby ocenić wpływ oporów ruchu masy i szybkość reakcji biologicznej.

Najtrudniejszym zagadnieniem w określeniu reżimu procesu z udziałem mikroorganizmów strzępkowych rosnących w formie makroskopowych peletek jest uzyskanie odpowiednich danych eksperymentalnych, przede wszystkim ekspe-

rymentalne wyznaczenie efektywnego współczynnika dyfuzji czy współczynników wnikania masy. Niezbędne jest do tego wyznaczenie stężenia tlenu na powierzchni peletki, profilu stężenia tlenu w całej peletce, czy też zmian w czasie stężenia tlenu wewnątrz peletki. Jest to możliwe z wykorzystaniem specjalnych umieszczonych na mikromanipulatorach mikroelektrod tlenowych, których wierzchołek ma średnicę rzędu mikrometrów. Pionierskie badania na ten temat przeprowadzili Wittier ze współpracownikami już w roku 1986. Zmierzyli oni profile tlenu w peletkach *Penicillium chrysogenum* w obecności i bez przepływu cieczy wokół peletek (Wittier et al., 1986). Pomiary profilu stężenia tlenu odnieśli do struktury peletek zbadanej technikami histologicznymi oraz sformułowali model matematyczny procesu transportu tlenu w peletkach. Hille *et al.* (2009) przedstawili metodę pomiaru efektywnego współczynnika dyfuzji w peletkach *Aspergillus niger* z wykorzystaniem dwóch mikroelektrod tlenowych oraz obliczeń na podstawie drugiego prawa Ficka. Wartości efektywnych współczynników dyfuzji w peletkach grzybów strzępkowych są rzędu 10^{-9} - 10^{-10} m² s⁻¹. Badania z użyciem mikroelektrod tlenowych prowadzone dla peletek *Aspergillus terreus* wykazały na podstawie obliczeń modułu Weisza, że wzrost biomasy jest limitowany dyfuzją tlenu w peletce, nawet jeżeli średnica peletki nie przekracza 2000 µm (Gonciarz i Bizukojć, 2014). Przykładowy profil stężenia tlenu w peletce oraz w warstwie granicznej (błonce ciekłej) został przedstawiony na rys. 4.6.



Rys. 4.6. Profil stężenia tlenu w peletce *Aspergillus terreus* ATCC 20542 uzyskany podczas pomiaru mikroelektrodą tlenową w warunkach braku przepływu

Źródło: opracowanie własne.

Zastanowić się jeszcze należy, w jaki sposób można zintensyfikować ruch masy w bioreaktorach, w których mikroorganizm strzępkowy rośnie w postaci peletek. Przede wszystkim zarówno na wewnętrzny, jak i zewnętrzny współczynnik efektywności ma wpływ szybkość reakcji biologicznej. Im jest ona mniejsza (na pierwszy rzut wygląda to na paradoks, ale wyraźnie na to wskazują równania 4.29 i 4.37), tym mniejsza jest szansa, że opory ruchu masy będą odgrywać znaczącą rolę. Oczywiście zbyt mała szybkość zużywania substratów (tlenu), a co za tym idzie całego metabolizmu, może negatywnie wpłynąć na efektywność procesu bioreaktorowego. W przypadku oporów zewnętrznych intensyfikacja ruchu masy jest również związana ze wzrostem współczynnika wnikania masy oraz stężeniem substratu (tlenu) w rdzeniu cieczy. Jedno i drugie można osiągnąć przez zwiększenie burzliwości przepływu wokół peletek, czyli intensywności mieszania w bioreaktorze. Zwiększenie stężenia tlenu na powierzchni peletki również intensyfikuje wewnętrzny ruch masy poprzez zwiększenie siły napędowej procesu. Można to uzyskać przez wzbogacenie w tlen powietrza używanego do napowietrzania w bioreaktorze.

Last but not least, bardzo dużo zyskuje się poprzez zmniejszenie wielkości peletek (wpływa to zarówno na zewnętrzne, jak i wewnętrzne opory ruchu masy) oraz zmianę ich struktury (zmniejszenie oporów dyfuzji wewnątrz peletki dzięki wzrostowi efektywnego współczynnika dyfuzji), czyli innymi słowy, poprzez zmianę morfologii grzybni. Stąd pomysł sterowania morfologią grzybni poprzez techniki inżynierii morfologicznej w celu zmiany morfologii zwartej z większych do mniejszych peletek, czy wręcz do grzybni rozproszonej jest w tym przypadku w pełni uzasadniony. Jednakże, biorąc dodatkowo pod uwagę trudności z wnikaniem tlenu od pęcherzyka powietrza do podłoża, szczególnie w układach z morfologią rozproszoną, może być ostatecznie trudno jednoznacznie stwierdzić, która forma morfologiczna grzybni jest korzystniejsza, jednocześnie z punktu widzenia mieszania zawiesiny w bioreaktorze i transportu tlenu od pęcherzyka powietrza do komórek mikroorganizmu oraz biosyntezy pożądanego metabolitu bądź enzymu. Wymaga to szczegółowej analizy układu z konkretnym mikroorganizmem strzępkowym. Ale i tak forma morfologiczna grzybni pozostaje najważniejszym czynnikiem wpływającym na mieszanie i napowietrzanie bioreaktorów, a to, która forma morfologiczna pozwoli na lepszą wydajność biosyntezy metabolitu, generalnie zależy od tego, w jakim stopniu tlen odgrywa rolę w biosyntezie pożądanego związku.

5. Sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych

Sterowanie to oddziaływanie przez odpowiednie czynniki na dany obiekt tak, aby osiągnąć pożądany cel. Obiektem sterowania w poniższych rozważaniach są komórki mikroorganizmów strzępkowych rosnące w hodowli wglębnej. Celem sterowania jest uzyskanie optymalnej, z punktu widzenia prowadzenia procesu oraz wydajności biosyntezy pożądanych metabolitów i enzymów, morfologii mikroorganizmu. Czynniki (metody, sposoby), za pomocą których możliwe jest sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych, zostaną omówione w tym rozdziale.

W literaturze naukowej opisano szereg metod sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych. Zostały one zestawione w tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Metody sterowania morfologią promieniowców i grzybów strzępkowych oraz wybrane przykłady ich zastosowań

Metoda	Mikro-organizmy	Mechanizm działania	Literatura
Metody tradycyjne			
Zmiana stężenia (liczby, gęstości) spor w inokulum, prekultury lub właściwej hodowli	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Szybkość agregacji spor zależy od stężenia spor, co powoduje zmianę wielkości peletek lub nawet ich nieutworzenie	Tucker i Thomas (1992) Nielsen <i>et al.</i> (1995) Papagianni i Matthey (2004) Grimm <i>et al.</i> (2004) Liu <i>et al.</i> (2008) Bizukojć i Ledakowicz (2010)
Poziom pH i zmiany poziomu pH podłoża	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptomyces tendae</i>	Zmiana pH silnie oddziałuje na agregację spor, zmieniając właściwości powierzchniowe pojedynczych spor, przez co tworzą się albo peletki albo grzybnia rozproszona	Galbraith i Smith (1969) Vecht-Lifshitz <i>et al.</i> (1990) Carlsen <i>et al.</i> (1996) Mainwaring <i>et al.</i> (1999) Papagianni (2004) Grimm <i>et al.</i> (2005)
Naprężenia mechaniczne związane z mieszaniem i napowietrzaniem podłoża w bioreaktorze	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Naprężenia mechaniczne zależą od szybkości napowietrzania oraz prędkości i mocy mieszania zawiesiny mikroorganizmów w bioreaktorze; powodują zakłócenie procesu agregacji spor oraz destrukcję już utworzonych aglomeratów	Mitard i Riba (1986) Nielsen i Krabben (1995) Nielsen <i>et al.</i> (1995) Lejeune and Baron (1995) Cui <i>et al.</i> (1998) Papagianni <i>et al.</i> (1998) Amanullah <i>et al.</i> (2002), Wang <i>et al.</i> (2003) Kelly <i>et al.</i> (2004) Casas López <i>et al.</i> (2005) Kelly <i>et al.</i> (2006) Li <i>et al.</i> (2008) Lin <i>et al.</i> (2010)

Tabela 5.1 (cd.)

Metody nowoczesne (inżynieria morfologiczna)			
Hodowla z mikrocząstkami mineralnymi (<i>microparticle-enhanced cultivation</i> , MPEC)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Caldariomyces fumago</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Trichoderma atroviridae</i> <i>Aspergillus ficcum</i> <i>Aspergillus sojae</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Pleurotus sapidus</i> <i>Mortierella isabelina</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Polega na oddziaływaniu mikrocząstek na aglomerację spor lub strzępek, co daje możliwość sterowania procesem przez dobór stężenia i wielkości cząstek przy danej liczbie spor; powoduje zmniejszenie średniej średnicy peletek aż do przejścia grzybni do morfologii rozproszonej	Kaup <i>et al.</i> (2008) Driouch <i>et al.</i> (2010a) Driouch <i>et al.</i> (2010b) Driouch <i>et al.</i> (2011) Driouch <i>et al.</i> (2012) Gonciarz i Bizukojć (2014) Gao <i>et al.</i> (2014) Etschman <i>et al.</i> (2015) Gonciarz <i>et al.</i> (2016) Antecka <i>et al.</i> (2016) Coban <i>et al.</i> (2015) Coban i Demirici (2016) Yatmaz <i>et al.</i> (2016)
Zmiana osmolalności podłoża przez dodatek chlorku sodu	<i>Aspergillus niger</i>	Ciśnienie osmotyczne zmienia oddziaływanie między sporami i strzępkami zmniejszając średnicę peletek; dodatkowo wpływa na fizjologię komórek	Wucherpennig <i>et al.</i> (2011)
Zmiana lepkości (przez dodatek naturalnych polimerów) i napięcia powierzchniowego (przez dodatek syntetycznych środków powierzchniowo czynnych) podłoża hodowlanego	<i>Streptomyces hygroscopicus var. geldanus</i>	Zmiany właściwości fizykochemicznych podłoży utrudniają proces agregacji spor zmniejszając wielkość peletek	O’Cleirigh <i>et al.</i> (2005) Dobson <i>et al.</i> (2008)
Zmiany genetyczne	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus glaucus</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Delecja bądź wzmocnienie odpowiednich genów wpływa na wzrost i różnicowanie się strzępek grzybni, przez co silnie zmienia morfologię mikroorganizmu	Müller <i>et al.</i> (2002a) van Wezel <i>et al.</i> (2006) Cai <i>et al.</i> (2014)

Źródło: opracowanie własne na podstawie Krull *et al.* (2013), zaktualizowane.

Metody te można podzielić na dwie grupy: metody tradycyjne oraz metody nowoczesne (Krull *et al.*, 2013). Te tradycyjne są znane od lat 60. XX wieku i, ogólnie rzecz biorąc, polegają na wykorzystaniu czynników procesowych i środowiskowych, które mają wpływ na kształtowanie się morfologii mikroor-

ganizmów strzępkowych w hodowlach wglębnych. Wobec tych metod w ówczesnej literaturze przedmiotu nie używano określenia inżynieria morfologiczna. Metody nowoczesne, to te, o których mówiąc, zwykle używa się w literaturze pojęcia inżynieria morfologiczna lub inżynieria morfologii (tabela 5.1).

5.1. Tradycyjne metody sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych

5.1.1. Liczba spor w podłożu

Najsilniejszym czynnikiem oddziałującym na wielkość aglomeratów (peletek) mikroorganizmów strzępkowych w hodowli wglębnej jest liczba spor wprowadzonych do podłoża zwana gęstością inokulum. Wyrażana jest ona jako liczba spor na objętość podłoża. Dla grzybów strzępkowych waha się zazwyczaj od 10^7 do 10^{11} l⁻¹. Niezależnie od tego, czy hodowla jest dwuetapowa (prekultura – podłoże produkcyjne), czy też inokulacja jest prowadzona bezpośrednio ze spor, to uzyskane zależności wpływu liczby spor na morfologię mikroorganizmów są podobne.

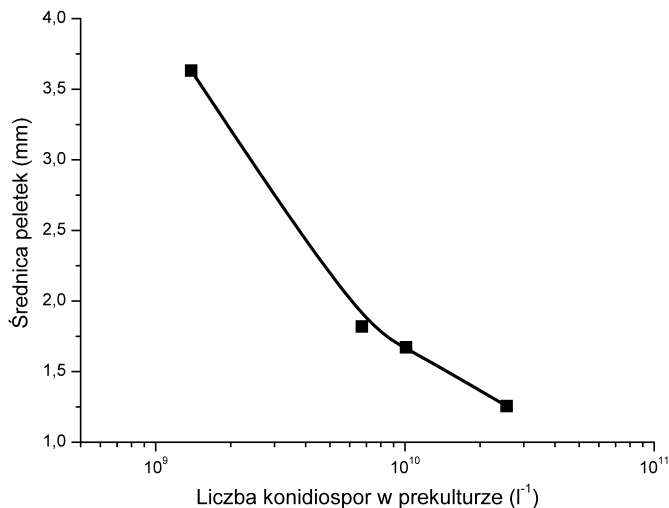
Ilościowa zależność między liczbą spor wprowadzonych do podłoża a liczbą i wielkością utworzonych peletek zależy przede wszystkim od mechanizmu tworzenia aglomeratów przez dany mikroorganizm. Znane są orientacyjne wartości granicznych gęstości inokulum, przy których obserwuje się morfologię zwartą (peletki). Dla grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus* (*Aspergillus niger*) dla liczby konidiospor poniżej 10^{11} l⁻¹ formują się peletki (van Suijdam *et al.*, 1980), natomiast *Penicillium chrysogenum* tworzy peletki, gdy konidiospor jest mniej niż 10^7 l⁻¹ (Calam, 1987). Tucker i Thomas (1994) wykazali, że gwałtowne przejście pomiędzy morfologią rozproszoną i zwartą dla *Penicillium* sp. występuje przy liczbie $5 \cdot 10^8$ konidiospor na litr. Te odmienne liczby spor, przy których następuje zmiana morfologii, wynikają z tego, że u *Aspergillus* sp. mamy do czynienia z mechanizmem koagulacyjnym tworzenia peletek, zaś u *Penicillium* sp. z aglomeracją wykiełkowanych strzępek.

Dla grzybów tworzących peletki w sposób koagulacyjny, jak *Aspergillus*, występuje prosta zależność: im więcej konidiospor danego grzyba strzępkowego wprowadzi się do podłoża, tym mniejsze peletki powstaną. Dodatkowo tych mniejszych peletek w jednostce objętości będzie zawsze więcej niż większych. W literaturze można również spotkać zależności ilościowe wiążące liczbę spor użytych do inokulacji z liczbą uzyskanych z nich peletek. Na przykład dla *Aspergillus terreus* wytwarzającego lowastatynę w hodowli dwuetapowej (prekultura-podłoże produkcyjne) istnieje zależność (Bizukojć i Ledakowicz, 2010):

$$n_p = 4.48 \cdot 10^{-6} \cdot (\pm 2.85 \cdot 10^{-7}) \cdot n_s \quad (5.1)$$

gdzie: n_p i n_s są odpowiednio liczbą konidiospor użytych do inokulacji i liczbą uzyskanych peletek. Wynika z niej, że liczba utworzonych peletek rośnie

liniowo wraz z liczbą wprowadzonych spor. Jednak zależność między średnią średnicą peletek a liczbą wprowadzonych spor jest nieliniowa (rys. 5.1).



Rys. 5.1. Zależność pomiędzy liczbą spor wprowadzoną do prekultury a średnią średnicą peletek *Aspergillus terreus* w podłożu produkcyjnym; stosunek inokulacji prekultury do podłoża produkcyjnego 7:150

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych zawartych w Bizukojć i Ledakowicz, (2010).

Wzrost liczby konidiospor w inokulum zwiększa w pewnym zakresie szybkość ich aglomeracji, co zostało wykazane w badaniach nad *Aspergillus niger*, w których wykorzystywano laserową technikę zliczania cząstek (Grimm *et al.*, 2004). Tworzenie aglomeratów jest dwufazowe, co zostało już opisane w rozdziale 2.3.2, a w drugiej fazie aglomeracji szybkość agregacji cząstek (aglomeratów konidiospor) rośnie wraz z ich liczbą w zawiesinie, osiągając maksimum na poziomie około $3,5 \cdot 10^9$ konidiospor na litr. Powyżej tej liczby szybkość agregacji zaczyna wyraźnie maleć (rys. 2.11).

W przypadku występowania mechanizmu aglomeracji strzępek, jak u *Penicillium* sp., wykazano, że przy małej liczbie spor liczba aglomerujących strzępek jest niewielka, co sprawia, że peletki są mniejsze. Wraz ze wzrostem liczby strzępek wywołanej wzrostem liczby spor tworzą się większe peletki. Zatem ta zależność jest odwrotna niż u grzybów tworzących peletki koagulacyjnie (Nielsen *et al.*, 1995). Istnieją jednak również dane pokazujące u *Penicillium* sp. zależność między liczbą konidiospor i wielkością aglomeratów podobną jak u grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Badania prowadzone dla *Penicillium chrysogenum* w jednostopniowej hodowli wstrząsanej w zakresie gęstości inokulum od $5 \cdot 10^7$ do $1 \cdot 10^9$ l^{-1} pokazały, że poniżej $2,5 \cdot 10^8$ l^{-1} praktycznie wszystkie cząstki grzybni były w formie zwartej, tworząc peletki o polu powierzchni rzutu 0,55-0,7 mm^2 . Ta wyżej wspomniana gęstość inokulum okazała się wartością graniczną, powyżej której kończyła się dominacja form zwartych, a wielkość cząstek grzybni mierzona ich polem powierzchni ich rzutu obniżała się do wiel-

kości poniżej $0,1 \text{ mm}^2$, przechodząc stopniowo do formy rozproszonej. Dodatkowo okazało się, że zwiększenie gęstości inokulum wpływa na całkowitą długość strzępek (*total hyphal length*) oraz zwiększenie liczby wierzchołków i długości HGU (Tucker i Thomas, 1994). Również dla *Penicillium chrysogenum* w hodowli bioreaktorowej (objętość robocza 6 litrów) było obserwowane zjawisko zmiany formy morfologicznej grzybni. Gwałtowna zmiana wielkości aglomeratów z około $0,25 \text{ mm}^2$ do około $0,1 \text{ mm}^2$ następowała przy gęstości inokulum na poziomie około $6 \cdot 10^7 \text{ l}^{-1}$. Ta niższa graniczna wartość gęstości inokulum była związana z naprężeniami mechanicznymi oddziałującymi na aglomerację grzybni w bioreaktorze. Co również interesujące, wpływ gęstości inokulum na długość strzępek, długość HGU oraz liczby wierzchołków w hodowli bioreaktorowej był znikomy (Tucker i Thomas, 1994).

Grzyby niższe z rodzaju *Rhizopus* charakteryzują się mechanizmem niekoagulacyjnym tworzenia peletek. W hodowli wstrząsanej *Rhizopus nigricans* (grzyb o zdolności hydroksylacji progesteronu do $11\text{-}\alpha$ -hydroksyprogesteronu) wykazano jednak, że rozmiar peletek tego grzyba także zależy od gęstości inokulum (Znidarsic *et al.*, 2000). I w tym przypadku im więcej spor w inokulum, tym tworzą się mniejsze peletki, aż do przejścia do morfologii rozproszonej. Jednakże graniczna wartość gęstości inokulum, przy której następowało przejście do formy rozproszonej, zależała od prędkości obrotowej wytrząsarki: od $4 \cdot 10^5 \text{ l}^{-1}$ przy 100 min^{-1} do 10^7 przy 225 min^{-1} .

Liao *et al.* (2007) badali wpływ liczby spor *Rhizopus oryzae* w inokulum w zakresie od $1,5 \cdot 10^8$ do $1,5 \cdot 10^9 \text{ l}^{-1}$. Na przykład w podłożu PDB (*potato dextrose broth*) zawsze tworzyły się gładkie peletki, a ich liczba rosła od 20000 do 80000 na litr wraz ze wzrostem liczby spor. Średnica peletek zaś wyraźnie malała wraz ze wzrostem liczby spor w inokulum od 2500 do $1500 \mu\text{m}$. Zatem u *Rhizopus oryzae* zależności były podobne jak dla grzybów z rodzaju *Aspergillus*.

W przypadku promieniowców, u których także występuje niekoagulacyjny mechanizm tworzenia peletek, zwiększanie gęstości inokulum prowadzi do tworzenia mniejszych aglomeratów (peletek). Pokazano to dla *Streptomyces tendae* wytwarzającego przeciwgrzybiczy antybiotyk nikkomycynę w hodowli wstrząsanej (Vecht-Lifschitz *et al.*, 1990). Autorzy ci stosowali gęstości inokulum od $7,5 \cdot 10^2$ do $2,3 \cdot 10^9 \text{ l}^{-1}$. Przy gęstościach inokulum poniżej 10^3 spor na litr dominowały peletki o średnicach większych od $2000 \mu\text{m}$, zaś przekroczenie liczby spor równej 10^7 l^{-1} powodowało tworzenie bardzo małych peletek o stałej średnicy około $1000 \mu\text{m}$, które następnie ulegały rozpadowi, tworząc „grzybnię” o morfologii rozproszonej. Zasada nieaglomeracyjnego tworzenia peletek, czyli „jedna spora to jedna peletka”, spełnia się dla *Streptomyces tendae* do liczby spor równej 10^6 l^{-1} . Dla większych liczb spor może się pojawiać nieznaczna aglomeracja (do 300 spor na peletkę). Jest to jednak bardzo mała wartość w porównaniu z tą, jaką na przykład obserwuje się u *Aspergillus terreus* (mechanizm aglomeracyjny): powyżej 10000 spor na peletkę.

Analizując zależność między liczbą spor użytych do inokulacji a formą morfologiczną uzyskanej grzybni, należy zawsze pamiętać, że porównanie ma sens jedynie dla identycznych podłoży oraz w identycznych warunkach hydrodynamicznych (mieszanie i napowietrzanie). Skład podłoża może w różnym

stopniu wpływać na formę morfologiczną grzybni zaś naprężenia mechaniczne związane z mieszaniem i napowietrzaniem są jednym z najsilniejszych (obok liczby spor) czynników oddziałujących na morfologię grzybni (*vide*: rozdział 5.1.3).

Nie tylko z bezpłciowych spor rozwija się wglębne hodowle grzybów strzępkowych. Są gatunki grzybów należących do workowców, które wytwarzają małą liczbę spor. Jest to także przypadek hodowli grzybów podstawkowych klasy *Basidiomycetes*, które nie tworzą bezpłciowych spor, ale w wyniku procesu płciowego owocniki i rozdzielnopłciowe basidiospory. W takich sytuacjach podłoża hodowlane inokuluje się fragmentami grzybni, a tworzenie aglomeratów podobnych do peletek (tu mogą częściej się pojawiać inne kształty niż idealna kula) następuje w wyniku aglomeracji tych fragmentów strzępek. Wielkość fragmentów strzępek w inokulum oraz ich gęstość wpływa na proces tworzenia aglomeratów. Zostało to pokazane dla *Cunninghamella echinulata* produkującego kwas γ -linolenowy. Grzyb ten nie wytwarza obficie bezpłciowych spor, przez co jest uniemożliwiony tradycyjny sposób inokulacji. Większe cząstki strzępek sprzyjały tworzeniu aglomeratów, zaś im drobniejsze fragmenty strzępek były użyte (strzępki były w różnym stopniu homogenizowane), tym mniejsze tworzyły się peletki (Chen i Liu, 1997).

Podsumowując, manipulacja liczbą spor prowadzi do uzyskania różnych form morfologicznych grzybów strzępkowych i promieniowców zależnie od mechanizmu tworzenia aglomeratów. Jednak zwiększanie gęstości inokulum w celu zmiany morfologii może być kłopotliwe ze względu na konieczność wytwarzania większej liczby sporulacyjnych hodowli na podłożu stałym oraz dokładnego mierzenia liczby spor użytej do rozpoczęcia danej hodowli.

5.1.2. Wpływ poziomu pH

Dla grzybów strzępkowych istnieją zależności między poziomem pH podłoża, w którym rosną, a ich formą morfologiczną. W szczególności poziom pH silnie oddziałuje na grzyby o koagulacyjnym mechanizmie tworzenia peletek, jak te z rodzaju *Aspergillus*. Poziom pH wpływa na agregację spor, co sprawia, że im jest on wyższy, tym większa tendencja do tworzenia zwartych form morfologicznych typu peletki. Przykładowo *Aspergillus oryzae*, producent α -glukoamylazy przy pH poniżej 2,5 tworzy spuchnięte komórki z dużą liczbą wakuoli i słabo rośnie. Ale już przy pH równym 3-3,5 ten wzrost jest dobry, a dominującą formą morfologiczną są wolne strzępki, czyli morfologia rozproszona. W zakresie pH od 4 do 5 pojawiają się zarówno peletki, jak i wolne strzępki, a przy pH powyżej 6 występują jedynie peletki. Co więcej, wraz ze wzrostem pH rośnie średnica peletek (Carlsen *et al.*, 1996). Dla *Penicillium chrysogenum*, u którego tworzeniem peletek rządzi mechanizm aglomeracji strzępek, pH nie ma aż tak dużego znaczenia. Jednakże przy pH powyżej 6 obserwuje się skrócenie długości strzępek grzybni, które osiągają swą minimalną wartość dla pH w zakresie 7-7,4 (Pirt i Callow, 1959).

U grzybów niższych (*Zygomycetes*) obserwuje się niezbyt silny wpływ pH na prawdopodobieństwo tworzenia peletek, co widać na przykładzie *Rhizopus* sp.

i *Rhizomucor* sp. Przy pH równym 5 to prawdopodobieństwo jest wyższe niż przy pH równym 4 lub 6 (Nyman *et al.*, 2013), chociaż istnieją gatunki należące do *Rhizopus* sp., które tworzą peletki przy pH równym około 3 (Zhou *et al.*, 2000). Odwrotnie sytuacja przedstawia się u promieniowców. W tym przypadku większe peletki można uzyskać przez obniżenie pH (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990). Przy optymalnym poziomie pH (między 7 i 8) dla wzrostu *Streptomyces tendae* powstają bardzo małe peletki o średnicach około 100-200 μm . Obniżenie pH do 4 wywołuje tworzenie peletek większych prawie o rząd wielkości (1200-1500 μm).

Głównym problemem wykorzystywania różnego poziomu pH do sterowania morfologią grzybni jest to, że pH silnie wpływa na szybkość wzrostu mikroorganizmu i produkcję metabolitów bardziej na poziomie katabolizmu i anabolizmu niż na samą morfologię mikroorganizmu. Do produkcji pożądanego metabolitu jest wymagane optymalne pH. Wyżej wspomniany *Penicillium chrysogenum* najszybciej rośnie przy pH równym 6 zaś dla wytwarzania penicyliny optymalne pH to 7,4. Stąd też przy produkcji penicyliny stosuje się dwuetapowy proces (faza wzrostu przy pH poniżej 7 i faza produkcji w warunkach bardziej alkalicznych). Tworzenie α -glukoamylazy przez *Aspergillus oryzae* jest najwydajniejsze przy pH równym 6, zaś wzrost grzybni jest optymalny w szerokim zakresie od 3 do 7 (Grimm *et al.*, 2005). *Aspergillus terreus* wytwarza lowastatynę przy pH powyżej 7, a nawet do 7,8, choć początkowe pH hodowli wynosi zazwyczaj 6,5. Obniżenie pH hamuje biosyntezę i wydzielanie lowastatyny w postaci β -hydroksykwasu, kwasu mewinolinowego, do podłoża (Bizukojć *et al.*, 2012). W powyższych przykładach ze względu na wartości pH preferowane jest tworzenie grzybni w postaci peletek. Natomiast w przypadku *Aspergillus niger* produkującego kwas cytrynowy pH w okolicach 2,5 i nieco poniżej jest optymalne dla wytwarzania tego metabolitu. Wtedy grzybnia jest raczej rozproszona, a jeśli pojawiają się peletki, to są one raczej owłosione i o delikatnej strukturze (Bizukojć i Ledakowicz, 2003; Papagianni, 2004). W tym przypadku podniesienie pH na przykład w celu uzyskania zwartych peletek jest szkodliwe i prowadzi do wytwarzania produktów ubocznych jak kwas szczawiowy (Papagianni, 2004).

Podsumowując, trzeba stwierdzić, że jakiegokolwiek uogólnienia efektu pH na morfologię mikroorganizmów strzępkowych są ryzykowne. Tutaj nawet w ramach jednego rodzaju *Aspergillus* czy *Rhizopus* wartości pH, przy których tworzy się forma speletyzowana mogą być dla różnych gatunków różne. Co więcej, przydatność zmieniania poziomu pH podłoża w celu sterowania morfologią grzybni jest mocno wątpliwa. Zmiana pH (o jednostkę lub dwie) nieznacznie wpłynie na morfologię grzybni, a może się okazać szkodliwa z punktu widzenia biosyntezy pożądanego metabolitu.

5.1.3. Wpływ naprężeń mechanicznych na morfologię mikroorganizmów strzępkowych

Naprężenia mechaniczne pojawiające się w bioreaktorach związane są z napowietrzaniem i mieszaniem zawiesin grzybów strzępkowych i promieniowców.

Nie da się ich uniknąć, gdyż konieczne jest dostarczenie odpowiedniej ilości tlenu niezbędnych do prawidłowego wzrostu tych aerobowych mikroorganizmów. Zagadnienia związane z naprężeniami mechanicznymi w bioreaktorach, w których prowadzona jest wgłębna hodowla mikroorganizmów strzępkowych, są w literaturze znacznie szerzej omawiane niż tylko w kontekście sterowania morfologią grzybni. Często zdarza się tak, że zmiany morfologii grzybni w bioreaktorach zbiornikowych mieszadłowych są niepożądanym efektem zwiększania intensywności napowietrzania i mieszania.

Jak już wspomniano w rozdziale 4.2 mieszanie jest operacją mechaniczną, której celem jest zmniejszenie niejednorodności w mieszanym płynie oraz eliminacje gradientów stężeń, temperatury i ujednolicenie innych właściwości fizykochemicznych w mieszanym płynie. Aby dokładnie określić to, w jaki sposób ta mechaniczna operacja oddziałuje na morfologię mikroorganizmów strzępkowych rosnących wgłębnie w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym, należy najpierw się przyjrzeć mechanizmom rządzącym tym procesem.

Proces mieszania składa się z trzech etapów. Etap pierwszy zwany jest dystrybucją (makromieszaniem) i jest najwolniejszy. Wzrost prędkości obrotowej mieszadła na tym etapie wywołuje turbulencję oraz tworzenie wirów. Należy podkreślić, że optymalne z punktu widzenia energetycznego jest mieszanie właśnie w obszarze turbulentnym, o czym była mowa w rozdziale 4.2. Drugi etap zwany dyspersją to zmniejszanie się wielkości wirów i przekształcanie energii kinetycznej wirów w energię cieplną. Zależnie od skali procesu może to być albo makromieszanie albo mikromieszanie. Trzeci etap to mikromieszanie. Wewnętrzne części wirów poruszają się laminarnie, przez co mamy do czynienia z mechanizmem dyfuzyjnym ruchu ciepła i masy. Chociaż dyfuzja jest powolna, to i tak, biorąc pod uwagę wielkość wirów, wystarczająco skuteczna, aby sprawnie wyrównywać gradienty stężeń czy temperatury. Wielkość najmniejszego możliwego wiru w procesie mieszania określona jest w przybliżeniu długością skali Kołmogorowa (skali turbulencji):

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (5.2)$$

gdzie: ε jest lokalną szybkością dyssypacji energii dla jednostki masy płynu ($\text{m}^2 \text{s}^{-3}$) zależną od prędkości obrotowej mieszadła, a ν lepkością kinematyczną płynu ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), będącą stosunkiem lepkości dynamicznej (Pa s) i gęstości cieczy (kg m^{-3}).

W typowych bioreaktorach dla zawiesin mikroorganizmów o lepkościach dynamicznych zbliżonych do lepkości wody (rzęd wielkości 10^{-3} Pa s) długość skali Kołmogorowa wynosi $\lambda = 30\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$. Oczywiście im wyższa lepkość zawiesiny, tym długość skali Kołmogorowa jest większa. Kiedy analizuje się naprężenia mechaniczne oddziałujące na mikroorganizm, ważne jest to, że jeżeli wielkość cząstek znajdujących się w bioreaktorze (bakterie, drożdże, strzępki czy peletki grzybni) jest porównywalna lub większa od długości skali Kołmogorowa w danych warunkach hydrodynamicznych panujących w bioreaktorze, to

naprężenia mechaniczne są wystarczająco silne, aby je zniszczyć. Na przykład peletki grzybni mogą ulec rozpadowi i utworzyć zawieszinę podobną do tej, która tworzy się naturalnie podczas wzrostu rozproszonego grzybni. Co więcej, takie oddziaływania mogą wpłynąć na aglomerację spor czy strzępek już na wczesnym etapie tworzenia się danej formy morfologicznej grzybni. Gdyby lepkość zawieszin mikroorganizmów strzępkowych była zbliżona do lepkości wody, to praktycznie organizmy te nie powinny rosnać w postaci makroskopowych peletek w bioreaktorach, gdyż najmniejsze tego typu peletki są co najmniej pięciokrotnie większe od wielkości wirów. Jednak w przypadku zawieszin mikroorganizmów strzępkowych ich lepkość rośnie z różnym tempem zależnie od hodowli i tworzącej się morfologii grzybni. Wtedy długość skali Kołmogorowa może być znacznie większa niż dla cieczy o lepkości wody i negatywny efekt naprężeń mechanicznych może się zmniejszyć.

Effekt oddziaływań mechanicznych na morfologię mikroorganizmów strzępkowych można łatwo przewidzieć. Im intensywniej bioreaktor jest mieszany i napowietrzany, tym mniejszych cząstek grzybni można się w nim spodziewać. Jednak nie musi się to przełożyć np. na lepszą produktywność mikroorganizmów.

W literaturze przedmiotu są opisane dziesiątki eksperymentów nad oddziaływaniem naprężeń mechanicznych na strzępki grzybów i promieniowców w bioreaktorach. Poniżej zostaną przedstawione wybrane przykłady najlepiej obrazujące efekty tych oddziaływań na mikroorganizmy strzępkowe o różnej morfologii i różnych mechanizmach tworzenia aglomeratów.

Smith *et al.* (1990) w badaniach nad fragmentacją grzybni *Penicillium chrysogenum* rosnącej w formie rozproszonej w bioreaktorach o objętości 10 i 100 litrów stwierdzili, że częstotliwość niszczenia strzępek grzybni (*breakup frequency*) jest proporcjonalna do mocy mieszania:

$$\text{breakup frequency} \propto \frac{P}{d_i^3 \cdot t_c} \quad (5.3)$$

gdzie: P jest mocą wprowadzoną (kW), d_i – średnicą mieszadła (m), a t_c czasem cyrkulacji (s).

Wzrost prędkości obrotowej mieszadła od 800 do 1200 min⁻¹ przy stałej szybkości napowietrzania 0,54 l_{pow} l⁻¹ min⁻¹ prowadził do spadku średniej całkowitej długości strzępek w czasie hodowli średnio o 50-100 μm, ale jednocześnie wywoływał tworzenie się rozgałęzień (spadek długości HGU o nawet o ponad 20 μm na wierzchołek i dwukrotny przyrost liczby wierzchołków). Efekt wzrostu szybkości napowietrzania na morfologię *Penicillium chrysogenum* był słabszy, bo przy wzroście z 0,3 do 0,54 l_{pow} l⁻¹ min⁻¹ różnice w długościach strzępek nie przekraczały 20 μm. Zwiększenie naprężeń mechanicznych prowadzące do zmniejszenia cząstek grzybni i zdecydowanie lepszych warunków napowietrzania hodowli powodowały jednak obniżenie wydajności produkcji penicyliny.

Destrukcyjność strzępek grzybni powoduje nie tylko zmianę morfologii, ale może również wpływać na wzrost biomasy. Dla *Rhizopus nigricans* istnieje

zależność, w której jako miarę wzrostu biomasy wykorzystano maksymalną właściwą szybkość jej wzrostu μ_{\max} (Reuss, 1988):

$$\mu_{\max} = \mu_{\max}^* - C' \left(\frac{P \cdot t_c}{V} \right)^{a'} \quad (5.4)$$

gdzie: μ_{\max}^* jest maksymalną właściwą szybkością wzrostu biomasy (h^{-1}) w sytuacji braku efektu jej niszczenia przez naprężenia mechaniczne, P – mocą mieszania (W), V – objętością bioreaktora (m^3), zaś t_c średnim czasem cyrkulacji (s). Parametry C' oraz a' są parametrami korelacyjnymi wyznaczonymi eksperymentalnie. Średni czas cyrkulacji zależy od wymiarów geometrycznych bioreaktora oraz mieszadła i prędkości obrotowej mieszadła a jednym z możliwych do jego obliczenia równań jest:

$$n \cdot t_c = 0.76 \cdot \left(\frac{H}{D} \right)^{0.6} \cdot \left(\frac{D}{d_i} \right)^{2.7} \quad (5.5)$$

gdzie: n – jest prędkością obrotową mieszadła (s^{-1}), H – wysokością cieczy w bioreaktorze (m), D – średnicą zbiornika (m), zaś d_i – średnicą mieszadła (m).

Człon $\frac{P \cdot t_c}{V}$ równania (5.4) jest ilością energii włożoną w mieszanie na objętość bioreaktora (W s m^{-3}).

W literaturze istnieją również zależności ilościowe między całkowitą długością strzępek L_T i szybkością dyssypacji energii ε (W/kg) uzyskane na podstawie badań różnych grzybów strzępkowych jak *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* czy *Aspergillus glaucus* (Cui *et al.*, 1997). Należy do nich równanie:

$$L_T \propto \varepsilon^{-0.25(\pm 0.08)} \quad (5.6)$$

W przypadku grzybów strzępkowych rosnących w postaci peletek oddziaływanie naprężeń mechanicznych prowadzi do jeszcze innych zmian morfologicznych. Casas Lopez *et al.* (2005) badali hodowlę *Aspergillus terreus* w bioreaktorze o objętości roboczej 5 litrów. Jako miarę oddziaływania mechanicznego zastosowali funkcję EDCF (*Energy Dissipation/Circulation Function*) wyrażoną w $\text{kW m}^{-3} \text{s}^{-1}$, która została zdefiniowana następująco:

$$EDCF = \frac{P_g}{k_c \cdot d_i^3 \cdot t_c} \quad (5.7)$$

gdzie: P_g – moc wprowadzona dla cieczy napowietrzanej (kW), k_c – stała geometryczna, d_i – średnica mieszadła (m) oraz t_c – czas cyrkulacji dla cieczy napowietrzanej (s).

Wzrost prędkości obrotowej mieszadła z 300 do 800 min⁻¹ w hodowli *Aspergillus terreus* poprawiał napowietrzenie i jednocześnie zmniejszała się wielkość peletek średnio z 2000-2500 μm do około 1000 μm. Wydajność biosyntezy lowastatyny ulegała jednak znaczącemu pogorszeniu. Między EDCF (kW m⁻³ s⁻¹) a średnicą peletek D_p (μm) została uzyskana empiryczna zależność potęgowa:

$$D_p = 4383 \cdot EDCF^{-0.34} \quad (5.8)$$

Również inni badacze potwierdzili, że dla *Aspergillus terreus* zmniejszenie wielkości peletek grzybni poprzez naprężenia mechaniczne nie prowadzi do zwiększenia wydajności biosyntezy lowastatyny Gonciarz *et al.* (2016).

Cui *et al.* (1997) podali również kilka eksperymentalnych zależności między szybkością dyssypacji energii i średnicą peletek. Do najbardziej ogólnej należy ta poniższa:

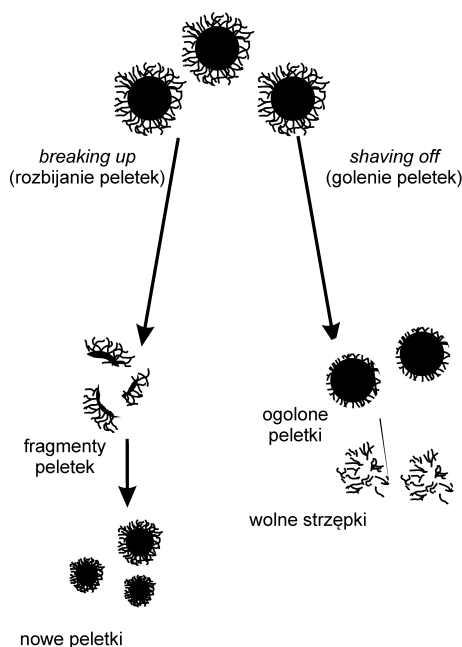
$$D_p \propto \varepsilon^{-0.4} \quad (5.9)$$

Natomiast ich własne wyniki eksperymentalne dotyczące hodowli *Aspergillus awamori* (organizm modelowy nieprodukujący żadnych metabolitów) w bioreaktorze pozwoliły na zaproponowanie zależności:

$$D_p \propto \varepsilon^{-0.16} \quad (5.10)$$

oraz przedstawienie dwóch mechanizmów powodujących zmiany morfologii grzybni w postaci peletek pod wpływem naprężeń mechanicznych. Są to „rozbijanie” peletek (*breaking up*) oraz „golenie” peletek (*shaving off*). Zostało to przedstawione na rys. 5.2.

W przypadku hodowli wglębnych promieniowców wzrost szybkości dyssypacji energii spowodowany wzrostem prędkości obrotowej mieszadła prowadzi do spadku średnicy peletek, co zostało wykazane dla *Streptomyces coelicolor* (Tough i Prosser, 1996). W granicach prędkości obrotowej mieszadła od 250 do 1000 min⁻¹ w bioreaktorze o objętości 1,6 litra średnica peletek maleje liniowo od 320 μm do nieco powyżej 100 μm. Jednocześnie grubość aktywnej zewnętrznej części peletek maleje z 39 do 30 μm. Wysoka szybkość dyssypacji energii powoduje powstawanie małych gładkich i zwartych peletek, natomiast niska szybkość dyssypacji energii prowadzi do powstania większych bardziej owłosionych peletek (Tough i Prosser, 1996).



Rys. 5.2. Schematyczne przedstawienie oddziaływania naprężeń mechanicznych na peletki grzybni w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym

Źródło: opracowanie własne na podstawie Cui *et al.* (1997).

Oddziaływania naprężeń mechanicznych zmieniające w znacznym stopniu morfologię grzybni niekoniecznie wpływają pozytywnie na produkcję pożądanego metabolitu, szczególnie u grzybów strzępkowych. Jednak trudno to uznać za regułę. Przykładem pozytywnego oddziaływania naprężeń mechanicznych jest produkcja kwasu klawulanowego przez *Streptomyces clavuligerus*. Zwiększenie prędkości obrotowej mieszania w bioreaktorze o objętości roboczej 4 litrów z 300 do 1000 min⁻¹ powoduje w przybliżeniu liniowy przyrost stężenia kwasu klawulanowego na koniec procesu do ponad 600 mg l⁻¹. Ta zależność jest w pełni uzasadniona, gdyż udowodniono, że kwas klawulanowy powstaje wyłącznie w komórkach wierzchołkowych, których powstawanie jest indukowane przez fragmentację „grzybni” promieniowca (Rosa *et al.*, 2005).

Podsumowując, należy pamiętać, że do każdego przypadku mniej lub bardziej zamierzonego wywoływania zmian morfologicznych grzybni przez naprężenia mechaniczne należy podchodzić indywidualnie, ponieważ nie ma zasady mówiącej, że wpływ tych naprężeń na wytwarzanie metabolitu jest jednoznacznie pozytywny bądź negatywny. Jest to często kwestia wyważenia tego, ile kosztem destrukcji grzybni, uzyskując pożądaną zmianę morfologii mikroorganizmu ułatwiający prowadzenie procesu bioreaktorowego, traci się na wydajności biosyntezy produktów metabolicznych. To, jak silne jest oddziaływanie naprężeń mechanicznych, podkreślili między innymi Vecht-Lifshitz *et al.* (1990). Posunęli się oni nawet do kontrowersyjnej, choć w znacznej mierze słusznej tezy, że podział mechanizmów tworzenia aglomeratów przez mikroor-

ganizmy strzępkowe na koagulacyjny i niekoagulacyjny nie ma sensu w układach, w których występują duże naprężenia mechaniczne, bo tak naprawdę to one rządzą tworzeniem się danej formy morfologicznej.

5.1.4. Inne czynniki wpływające na morfologię grzybni i ich przydatność do tradycyjnego sterowania morfologią grzybni

Na morfologię mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach wglębnych mogą również wpływać skład podłoża, w tym rodzaj i stężenie źródła węgla, azotu i fosforu, zawartość mikroelementów (kationy) i witamin, stężenie tlenu oraz dwutlenku węgla. Jak już wcześniej wspomniano, użyte źródło węgla może silnie zmieniać strukturę peletek, co obserwowano w przypadku producenta lowastatyny *Aspergillus terreus*. Zastosowanie glukozy jako źródła węgla prowadzi do uzyskania peletek gładkich o bardzo zwartej strukturze. Glicerol zaś sprawia, że peletki są miękkie, elastyczne i owłosione, zaś na laktozie uzyskuje się peletki o pośrednich właściwościach (Bizukojć i Ledakowicz, 2005; Bizukojć i Pecyna, 2011).

Temperatura hodowli jest także czynnikiem do pewnego stopnia determinującym morfologię grzybów strzępkowych i promieniowców. W przypadku grzybów niższych jak *Rhizopus* spp. i *Rhizomucor* sp. zmiana temperatury z 25 do 35°C zwiększa prawdopodobieństwo wzrostu w formie makroskopowych peletek.

Zwiększenie stężenia chlorku wapnia w podłożu do poziomu 5 g l⁻¹ sprzyja tworzeniu peletek, bo obecność dużych (w tym multiwalentnych) kationów oddziałuje na powierzchnię spor, sprzyjając ich aglomeracji (Braun i Vecht-Lifshitz, 1991). Obecność polikationów sprzyja wzrostowi grzybów w postaci peletek zaś polianionów, wręcz przeciwnie. Wynika to z faktu występowania ładunków elektrycznych na sporach i strzępkach grzybów i promieniowców (Elmayergi *et al.*, 1973, Dobson *et al.*, 2008).

U promieniowców obserwowano, że niski poziom nasycenia tlenem podłoża sprzyja tworzeniu drobnych peletek i form rozproszonych a wysoki, bardziej zwartych i większych (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990), co jest oczywiste w świetle praw rządzących dyfuzją substratu w peletkach. Należy również dodać, że czynnik temperatury i stężenie tlenu rozpuszczonego są ze sobą wzajemnie powiązane ze względu na silną zależność rozpuszczalności tlenu w podłożu od temperatury.

Jednakże przydatność tych czynników w sterowaniu morfologią mikroorganizmów strzępkowych jest mniejsza niż tych opisanych w podrozdziałach od 5.1.1 do 5.1.3. Wynika to przede wszystkim z faktu, że optymalny skład podłoża, strategię napowietrzania ustala się w kierunku optymalizacji biosyntezy pożądaných metabolitów. Te czynniki przede wszystkim oddziałują na metabolizm mikroorganizmu, a tylko dodatkowym efektem ustalenia parametrów fizjologicznych i procesowych jest konkretna morfologia danego mikroorganizmu powstająca w tych konkretnych warunkach. Niemniej jednak morfologia jest w ten sposób ściśle powiązana z produktywnością danego mikroorganizmu.

Istnieją natomiast pewne składniki podłoża, które mogą znacząco wpływać na formę morfologiczną mikroorganizmów strzępkowych, nie wpływając jednak tak silnie na sam metabolizm tych mikroorganizmów. Są to cząstki stałe obecne w podłożu. Będzie to na przykład wolnodegradowalny i przyswajalny substrat polisacharydowy, albo po prostu zanieczyszczenie mineralne bądź organiczne składników podłoża pochodzących ze źródeł odpadowych. Przykładem są opisane w literaturze hodowle *Aspergillus awamori* wytwarzającego hydrolityczny enzym ksylanazę z wykorzystaniem otrębów pszennych (Cui *et al.*, 1998, Schugerl *et al.* 1998). Zmienna zawartość cząstek stałych mocno wpływała na formę morfologiczną grzybni. Podobnie zaobserwowano, że cząstki węglanu wapnia w podłożu zmieniły produkcję lakkazy przez należący do *Basidiomycetes* grzyb *Trametes versicolor* (Tišma *et al.*, 2012). Również Nyman *et al.* (2015) zauważyli, że dodatek mikrocząstek do hodowli grzybów niższych znacznie obniża prawdopodobieństwo utworzenia form speletyzowanych. I te dość przypadkowe obserwacje potwierdzają sensowność stosowania jednej z nowoczesnych technik inżynierii morfologicznej, a dokładniej mówiąc hodowli z mikrocząstkami, której zostanie poświęcony podrozdział 5.2.2.

5.2. Nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej

Tradycyjne techniki inżynierii morfologicznej mogą być skutecznie stosowane do sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych. Korzystając z nich, można zmusić dany mikroorganizm strzępkowy do wzrostu albo w formie peletek, albo w formie rozproszonej. Każda z tych form ma swoje zalety i wady, możliwości i ograniczenia, co zostało wykazane w rozdziale 5.1. Niestety większość z tych tradycyjnych technik (zmiana składu podłoża, pH, obecność bądź jej brak mikroelementów) oprócz oddziaływania na morfologię grzybni, również w większym lub mniejszym stopniu zmienia metabolizm mikroorganizmów, co nie jest zawsze pożądane w przypadku wytwarzania danego metabolitu. Jedynie stosowanie zmiennych naprężeń mechanicznych, przede wszystkim przez zmianę prędkości obrotowej mieszadła oraz zmiany stężenia spor w inokulum oddziałują prawie wyłącznie na morfologię grzybni. W tych przypadkach zmiany warunków przenoszenia tlenu, a dokładniej zwiększenie dostępności tlenu, wywołane zmianą morfologii są czynnikiem fizjologicznym wpływającym na metabolizm.

Z powyższych względów narodziła się potrzeba znalezienia takich sposobów oddziaływania na morfologię mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach wgłębnych, które by w minimalnym stopniu oddziaływały na metabolizm i fizjologię mikroorganizmu. Jednocześnie powinny pozytywnie wpływać na wytwarzanie pożądanego metabolitu poprzez zmianę morfologii mikroorganizmu strzępkowego na tę optymalną. Ci badacze, którzy zaczęli jako pierwsi stosować nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej, przede wszystkim mieli na celu zmniejszenie wielkości aglomeratów grzybni (peletek), które uznawali za mniej korzystne (z punktu widzenia wytwarzania metabolitów przez badane mikroorganizmy strzępkowe), szczególnie wtedy, gdy ich średnica była

rzędu kilku milimetrów. Do nowoczesnych technik inżynierii morfologicznych należą hodowla z mikrocząstkami (*microparticle-enhanced cultivation*, MPEC), zmienianie lepkości i napięcia powierzchniowego podłoża hodowlanego, zmienianie osmolalności podłoża hodowlanego oraz modyfikacje genetyczne mikroorganizmów (Krull *et al.*, 2013).

5.2.1. Mikroorganizmy strzępkowe a inżynieria morfologiczna

Dotychczas wobec szesnastu mikroorganizmów strzępkowych, grzybów strzępkowych i promieniowców zostały zastosowane i szczegółowo przebadane nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej. Aby ułatwić dalsze rozważania i przede wszystkim uniknąć opisywania cech tych mikroorganizmów za każdym razem, kiedy będzie o nich mowa, w tabeli 5.2 zestawiono je wszystkie wraz z krótkim opisem ich cech charakterystycznych, szczególnie tych mających istotny wpływ na stosowanie nowoczesnych technik inżynierii morfologicznej.

Tabela 5.2. Mikroorganizmy strzępkowe, wobec których dotychczas zastosowano nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej

Mikro-organizm/ /szczep	Klasa	Charakterystyka mikro-organizmu	Zastosowana technika inżynierii morfologicznej	Wytwarzany metabolit lub enzym	Charakterystyka metabolitu lub enzymu
<i>Aspergillus niger</i> AB1.13	<i>Ascomycetes</i>	Mutant auksotroficzny wobec urydyny, ze zredukowaną zdolnością wytwarzania proteazy, produkuje α -glukoamylazę, której synteza kontrolowana jest poprzez indukowany promotor, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC, zwiększenie osmolalności podłoża	α -glukoamylaza (EC 3.2.1.3)	Enzym hydrolizujący skrobię
<i>Aspergillus niger</i> SKAn1015	<i>Ascomycetes</i>	Mutant zawierający gen <i>suc1</i> (β -fruktofuranazydazy) kontrolowany konstytutywnie przez promotor kinazy pirogronianowej <i>pkiA</i> , wytwarza bezpłciowe spory	MPEC, zwiększenie osmolalności podłoża	β -fruktofuranazydaza (EC 3.2.1.26)	Enzym hydrolizujący sacharozę do glukozy i fruktozy
<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	<i>Ascomycetes</i>	Szczep podstawowy, dziki, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	2-fenyletanol	Związek zapachowy o różanej woni wytwarzany z prekursora L-fenylalaniny

Tabela 5.2 (cd.)

<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	<i>Ascomycetes</i>	Szczep podstawowy, dziki, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	kwask mewinolinowy (lowastatyna)	Poliketydowy inhibitor reduktazy S-3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA obniżający u człowieka poziom endogennego cholesterolu
<i>Trichoderma atroviridae</i> IMI 206040	<i>Ascomycetes</i>	Szczep podstawowy, dziki słabo wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	6-pentylo- α -piron	Lakton orzecha kokosowego
<i>Aspergillus ficcum</i> NRRL 3135	<i>Ascomycetes</i>	Szczep podstawowy, dziki, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	fitaza (EC 3.1.3.8)	Enzym hydrolizujący (fosfataza) roślinne fitany, będące źródłem fosforu
<i>Caldariomyces fumago</i> DSM 1256	<i>Ascomycetes</i>	Szczep dziki, wytwarza mało bezpłciowych spor	MPEC	chloro-peroksydaza (EC 1.11.1.10)	Enzym (oksydoreduktaza) katalizujący chlorowanie związków organicznych wykorzystuje H_2O_2 jako kofaktor
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> NRRL 3602	<i>Actinomycetes</i>	Szczep dziki, wytwarza spory	Zmiany lepkości i napięcia powierzchniowego podłoża	geldanamycyna	benzochinonowy antybiotyk o szerokim spektrum działania
<i>Aspergillus oryzae</i> A1560 (IFO 4177)	<i>Ascomycetes</i>	Szczep dziki oraz mutanty z uszkodzonymi genami syntazy chitynowej <i>chsB</i> i syntazy chitynowej i miozyny <i>csmA</i>	Modyfikacje genetyczne	α -glukoamylaza (EC 3.2.1.3)	Enzym hydrolizujący skrobię
<i>Aspergillus oryzae</i> ChsB/G					
<i>Aspergillus oryzae</i> CM101					
<i>Aspergillus sojae</i> AsT1	<i>Ascomycetes</i>	Szczep rekombinowany genetycznie, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	β -mannanaza (EC3.2.1.25)	Enzym hydrolizujący terminalne reszty β -mannozy w β -D-mannozydach
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	<i>Zygomycetes</i>	Szczep dziki, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	kwask mlekowy	Metabolit pierwotny, hydroksykwask karboksylowy
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	<i>Zygomycetes</i>	Szczep dziki, wytwarza bezpłciowe spory	MPEC	triacyloglicerole i wolne kwasy tłuszczowe	Związki tłuszczowe do produkcji biopaliw

Tabela 5.2 (cd.)

<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Actinomycetes</i>	Szczepy ze wzmocnioną ekspresją morfogenu (<i>morphogene</i>) <i>SsgA</i> funkcjonalnie powiązanego z podziałami komórkowymi i morfogenezą, wytwarza bezpłciowe spory	Modyfikacje genetyczne	aktynorodyna	Antybiotyk poliketydowy
				undecyloprodigiozyna	Lek immunosupresyjny
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>Actinomycetes</i>			melanina	barwnik
				tyrozynaza (EC 1.14.18.1)	Enzym (oksydoreduktaza) utleniający związki fenolowe wykorzystujący tlen jako kofaktor
<i>Streptomyces limosus</i>	<i>Actinomycetes</i>			amylazy	Enzymy hydrolizujące skrobię
<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>Actinomycetes</i>			oksy-tetracyklina	Antybiotyk poliketydowy
<i>Streptomyces roseosporus</i>	<i>Actinomycetes</i>	Mutanty $\Delta AgkipA$ i $\Delta AgteaR$ -delecja genów spolaryzowanego wzrostu grzybów, wytwarza bezpłciowe spory	Modyfikacje genetyczne	daptomycyna	Antybiotyk lipopeptydowy
<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>Actinomycetes</i>			chloramfenikol	Antybiotyk o charakterze aromatycznym
<i>Aspergillus glaucus</i> CCTCC M 206022	<i>Ascomycetes</i>			aspergiolid A	Antybiotyk poliketydowy
<i>Cerrena unicolor</i> (Bull. ex Fr.) Murr strain 137	<i>Basidiomycetes</i>		MPEC	lakkaza (EC 1.10.3.2)	Enzym (oksydoreduktaza) utleniający związki fenolowe wykorzystujący tlen jako kofaktor
<i>Pleurotus sapidus</i> DSM 8266	<i>Basidiomycetes</i>		MPEC		
<i>Penicillium digitatum</i> DSM62840*	<i>Ascomycetes</i>	-	MPEC	enzymy	-
<i>Penicillium chrysogenum</i> DSM 848	<i>Ascomycetes</i>	-	MPEC	penicylina	Antybiotyk β -laktamowy
<i>Emericella nidulans</i> DSM 820	<i>Ascomycetes</i>	-	MPEC	kwas cholowy	-
<i>Aspergillus Niger</i> DSM 821	<i>Ascomycetes</i>	-	MPEC	kwas cytrynowy, kwas szczawowy	Kwasy organiczne
<i>Acremonium chrysogenum</i> DSM 880	<i>Ascomycetes</i>	-	MPEC	cefalosporyny	Antybiotyki β -laktamowe

Tabela 5.2 (cd.)

<i>Pleurotus sapidus</i> DSM 8266	<i>Basidiomycetes</i>	-	MPEC	enzymy	-
<i>Rhizopus oryzae</i> DSM 907	<i>Zygomycetes</i>	-	MPEC	sterydy	-
<i>Chaetomium globosum</i> DSM 1962	<i>Ascomycetes</i>	-	MPEC	celulazy	Enzymy hydrolizujące celulozę
<i>Streptomyces aureofaciens</i> DSM 40127	<i>Actinomycetes</i>	-	MPEC	chlorotetracyklina	Antybiotyki poliketydowy

* wobec szczepów wymienionych w tabeli na szarym tle przeprowadzono tylko pojedyncze proste badanie skriningowe MPEC (Kaup *et al.*, 2008), którego wyniki są przedstawione dalej w tabeli 5.5

Źródło: opracowanie własne.

5.2.2. Hodowla z mikrocząstkami

Obecnie najpowszechniej stosowaną techniką inżynierii morfologicznej jest dodawanie mineralnych mikrocząstek do podłoża hodowlanych (*microparticle-enhanced cultivation*, MPEC). Polega ona na tym, że w odpowiednim momencie hodowli płynnej do zawiesiny spor lub strzępek mikroorganizmów strzępkowych dodaje się mikrocząstki mineralne o odpowiedniej wielkości. Wzajemne oddziaływanie między mikrocząstkami a sporami i strzępkami powoduje zmianę morfologii strzępek grzybni, polegającą na zmniejszeniu wielkości aglomeratów (peletek), co ma prowadzić do zwiększenia wydajności biosyntezy pożądaných metabolitów.

5.2.2.1. Dobór mineralnych mikrocząstek dla maksymalizacji biosyntezy pożądaných metabolitów

Kluczowym elementem stosowania MPEC jest dobór mikrocząstek mineralnych. To właśnie ich zadaniem jest takie oddziaływanie na spory i strzępki (u tych grzybów, których hodowle wgłębne są rozwijane ze zhomogenizowanej grzybni), aby wpłynąć na procesy aglomeracji tychże spor oraz strzępek i w konsekwencji zmienić morfologię grzybni. Ważnym kryterium doboru mikrocząstek jest jak największa inertność chemiczna substancji wprowadzanej do danej hodowli. Przede wszystkim nie powinny się one rozpuszczać w wodzie oraz nie powinny być toksyczne wobec hodowanego mikroorganizmu strzępkowego.

Do tej pory stosowano następujące mineralne mikrocząstki: talk (krzemian magnezu) oraz tlenek glinu (Kaup *et al.*, 2008; Driouch *et al.*, 2010a; Driouch *et al.*, 2010b; Gonciarz *et al.*, 2012; Gonciarz i Bizukojć, 2014; Antecka *et al.*, 2016), krzemian tytanu (Driouch *et al.*, 2012), różne tlenki żelaza, tytanian glinu, krzemian glinu, kaolin, nanoglinkę, krzemionkę (Etschmann *et al.*, 2015). Również prowadzono eksperymenty z cząstkami organicznymi celulozy (Etschmann *et al.*, 2015). Jednak najpopularniejszymi mikrocząstkami pozostają

do tej pory talk oraz tlenek glinu. W tabeli 5.3 zestawiono dotychczas najczęściej stosowane mikrocząstki mineralne w hodowlach typu MPEC.

Tabela 5.3. Najczęściej stosowane mikrocząstki do hodowli typu MPEC*

Mikro-cząstki	Mikroorganizm	Metabolit/enzym	Literatura
talk (krzemian magnezu)	<i>Aspergillus niger</i> AB1.13 <i>Aspergillus niger</i> SKAn1015 <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 <i>Trichoderma atroviridae</i> IMI 206040 <i>Aspergillus ficcum</i> NRRL 3135	α -glukoamylaza β -fruktofuranozydaza lowastatyna 2-fenyloetanol 6-pentylo- α -piron fitaza	Driouch <i>et al.</i> , 2010a Driouch <i>et al.</i> , 2010b Gonciarz i Bizukojć, 2014 Etschman <i>et al.</i> , 2015 Etschman <i>et al.</i> , 2015 Coban <i>et al.</i> , 2015
tlenek glinu	<i>Caldariomyces fumago</i> DSM 1256 <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 <i>Trichoderma atroviridae</i> IMI 206040 <i>Aspergillus ficcum</i> NRRL 3135 <i>Cerrena unicolor</i> (Bull. ex Fr.) Murr strain 137 <i>Pleurotus sapidus</i> DSM 8266	chloroperoksydaza lowastatyna 2-fenyloetanol 6-pentylo- α -piron fitaza lakkaza lakkaza	Kaup <i>et al.</i> , 2008* Gonciarz i Bizukojć, 2012 Etschman <i>et al.</i> , 2015 Etschman <i>et al.</i> , 2015 Coban <i>et al.</i> , 2015 Antecka <i>et al.</i> , 2016 Antecka <i>et al.</i> , 2016
krzemian tytanu	<i>Aspergillus niger</i> SKAn1015 <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 <i>Trichoderma atroviridae</i> IMI 206040	β -fruktofuranozydaza 2-fenyloetanol 6-pentylo- α -piron	Driouch <i>et al.</i> , 2012 Etschman <i>et al.</i> , 2015 Etschman <i>et al.</i> , 2015

* w tabeli zestawiono tylko szczegółowe badania nad wzrostem mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach typu MPEC, działanie mikrocząstek wobec innych gatunków mikroorganizmów strzępkowych skrótkowo badane przez Kaupa *et al.* (2008) umieszczono w tabeli 5.5

Źródło: opracowanie własne.

Zagadnienie pełnej inertyności mikrocząstek mineralnych używanych przy MPEC zostało stosunkowo późno zbadane (Etschmann *et al.*, 2015). Wcześniej zakładano, że jeżeli dane mikrocząstki są nierozpuszczalne w podłożu, to nie ma żadnego problemu uwalniania się jakichkolwiek substancji. Jednakże coś takiego jak całkowita nierozpuszczalność w przyrodzie nie istnieje i okazało się, że nawet niektóre najczęściej stosowane mikrocząstki nie są całkiem inertne. Dotyczy to przede wszystkim talku. Trzeba jednak pamiętać, że brak pełnej inertyności nie musi być problemem, gdyż nie zawsze to, co się uwalnia z mikrocząstek, może być szkodliwe dla mikroorganizmu. Co więcej, takie dodatkowe mikroelementy mogą stymulować mikroorganizm, wobec którego zastosowano MPEC, ale wtedy trzeba spróbować odróżnić wpływ mikrocząstek na morfologię mikroorganizmu od ich wpływu na metabolizm.

W tabeli 5.4 przedstawiono wyniki badań nad inertynością mikrocząstek stosowanych i z potencjalnym zastosowaniem w MPEC (Etschmann *et al.*, 2015). Technika tego badania polegała na tym, że 2% (20 g l⁻¹) zawiesina danych mikrocząstek w wodzie destylowanej była inkubowana przez noc, a uwolnione do roztworu pierwiastki były analizowane z wykorzystaniem atomowej spektroskopii absorpcyjnej.

Tabela 5.4. Wymywanie pierwiastków z mikrocząstek

Mikrocząstki	Wzór chemiczny	Średnica nominalna (μm)	Uwalnianie pierwiastków
krzemian magnezu (talk)	3MgO·4SiO ₂ ·H ₂ O	10	Mg (2,826 mg l ⁻¹)
krzemian magnezu (talk)	3MgO·4SiO ₂ ·H ₂ O	40	Mg (2,952 mg l ⁻¹)
tlenek glinu	Al ₂ O ₃	27,2*	-
tytanian glinu	Al ₂ O ₃ ·TiO ₂	≤50	-
krzemian glinu	3Al ₂ O ₃ · 2SiO ₂	29,2*	-
krzemian wapnia	CaSiO ₃	74	Ca (45,105 mg l ⁻¹), Si (29,9 mg l ⁻¹)
krzemian tytanu	TiSiO ₄	≤50	-
dwutlenek krzemu	SiO ₂	7-12	Si (38,1 mg l ⁻¹)
kaolin	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	2,4*	Mg (0,097 mg l ⁻¹), Ca (0,807 mg l ⁻¹)
tlenek żelaza (II,III)	Fe ₃ O ₄	<5	-
tlenek żelaza (III)	Fe ₂ O ₃	<5	-
nanoglinka	-	≤25	Mg (8,693 mg l ⁻¹), Si (136,5 mg l ⁻¹), Ca (4,683 mg l ⁻¹), Al (81,12 mg l ⁻¹), Na (124,3 mg l ⁻¹)
celuloza (trzy rodzaje: 8, 32, 250 μm)	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	8-250	-
krzemian magnezu (Florisil®)	MgSiO ₃	250-595	Mg (18,738 mg l ⁻¹), Si (83,5 mg l ⁻¹), Na (359,5 mg l ⁻¹)

* średnica medianowa

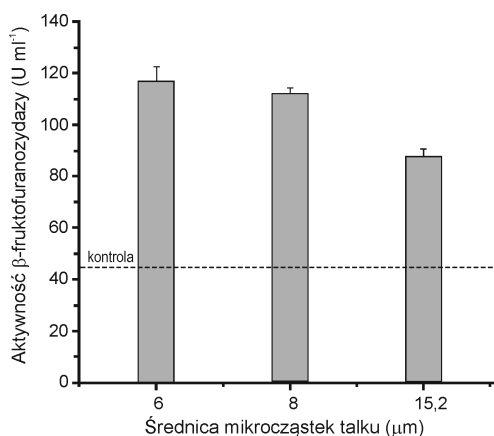
Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z: Etschmann *et al.* (2015).

Przykładem pozytywnego efektu wymywania mikroelementów z mikrocząstek jest produkcja 2-feniloetanolu przez *Aspergillus niger* DSM 821 w hodowli wstrząsanej. Otóż w podłożu zawierającym wypłukany magnez z mikrocząstek talku 40 μm (bez nich samych) wydajność wytwarzania tego metabolitu rosła o 10%, zaś w obecności tychże mikrocząstek o 36%. Z drugiej strony przykładem negatywnego efektu wymywania mikrocząstek jest zmiana pH pod ich wpływem, a dotyczy to np. krzemianu wapnia. Dodatek 20 g l⁻¹ krzemianu wapnia do podłoża z ekstraktem słodowym podnosi jego pH z 5,4 aż do 9,6, podobnie dzieje się przy dodatku krzemianu magnezu (wzrost do 9,2). Talk podnosi pH jedynie do 6,4.

To, że rodzaj mikrocząstek ma znaczenie przy hodowlach typu MPEC, widać wyraźnie przy porównaniu wytwarzania w hodowli wstrząsanej 2-feniloetanolu przez *Aspergillus niger* DSM 821 oraz 6-pentylo-α-pironu przez *Trichoderma atroviridae* IMI 206040. Przy stężeniu mikrocząstek na poziomie 20 g l⁻¹ w obu przypadkach 2-feniloetanol jest wydajniej wytwarzany przy użyciu 40 μm mikrocząstek talku, zaś 6-pentylo-α-piron przy użyciu mikrocząstek tlenku żelaza Fe₃O₄. Nie jest znane wytłumaczenie, dlaczego tak się dzieje, a Etschmann *et al.* (2015) uważają, że dobór rodzaju mikrocząstek jest sprawą zupełnie indywidualną dla danego szczepu i wytwarzanego przez niego metabolitu. Należy jednak zwrócić uwagę, że w tych badaniach nie dysponowano mikrocząstkami różnych substancji chemicznych, ale o tej samej średnicy (tabela 5.3), co mogło mieć wpływ na wyniki badań. A dzieje się tak, bo oprócz rodzaju mikrocząstek kolejnym bardzo istotnym czynnikiem, jeśli nawet nie istotniejszym, jest ich wielkość.

Właśnie ze względu na trudność doboru mikrocząstek o różnej wielkości tego samego związku chemicznego dostępność informacji na ten temat jest dość ograniczona. Kaup *et al.* (2008) testowali mikrocząstki kwarcu ($\sim 350\ \mu\text{m}$) oraz szklane kulki ($\sim 500\ \mu\text{m}$) wobec grzyba strzępkowego *Caldariomyces fumago* DSM 1256 i ich wpływ na wytwarzanie chloroperoksydazy. W pierwszym przypadku efekt zwiększenia biosyntezy enzymu pojawił się, ale był znacznie słabszy niż przy użyciu mikrocząstek tlenku glinu (o średniej średnicy rzędu kilku mikrometrów), natomiast duże szklane kulki nie wywołały żadnego efektu. Istotne jest zatem to, aby średnica mikrocząstek była porównywalna z wielkością spor grzybów. Driouch *et al.* (2010a) bardziej szczegółowo pokazali wpływ wielkości mikrocząstek talku na produkcję β -fruktofuranozydazy przez *Aspergillus niger* SKAn1015. Okazuje się, że najsukuteczniejsze są cząstki o średnicy między 6 a 10 μm . Właśnie te cząstki powodowały przejście ze struktury speletyzowanej do grzybni rozproszonej i uzyskanie najwyższych aktywności β -fruktofuranozydazy (rys. 5.3).

Ale nawet zastosowanie większych mikrocząstek o średnicy około 15 μm pozwala na uzyskiwanie większych aktywności β -fruktofuranozydazy niż w hodowlach kontrolnych bez mikrocząstek, z tym, że formą morfologiczną grzybni były wtedy mikropeletki.

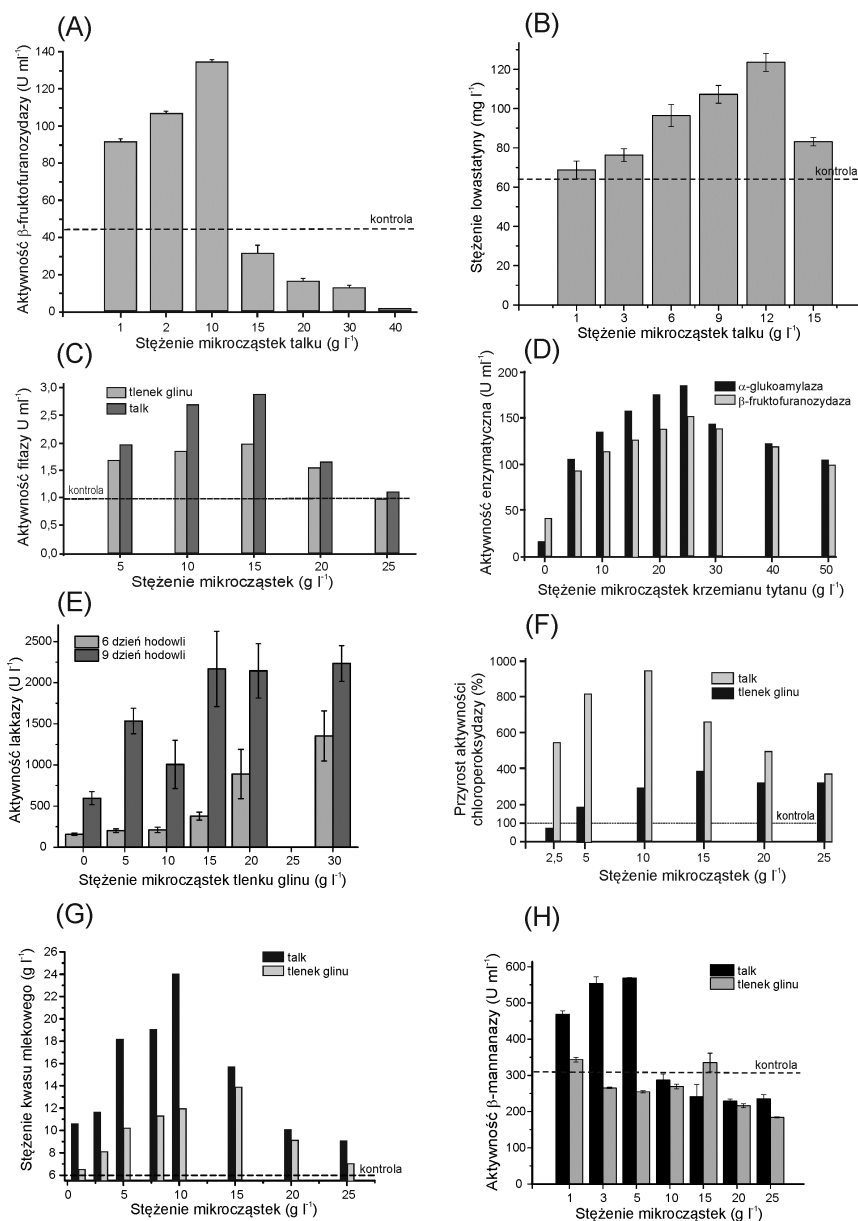


Rys. 5.3. Wpływ wielkości mikrocząstek talku na aktywność β -fruktofuranozydazy wytwarzanej przez *Aspergillus niger* SKAn1015; linia przerywana oznacza aktywność enzymu w hodowli bez mikrocząstek

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z Driouch *et al.* (2010a).

Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na wydajność hodowli MPEC jest stężenie mikrocząstek (rys. 5.4). Mikrocząstki oddziałują ze sporami i w ten sposób zmieniają morfologię grzybni przez co i wydajność produkcji metabolitów. Stąd stężenie mikrocząstek a ma kluczowy wpływ na morfologię grzybni. Nie ma natomiast żadnych zależności między liczbą spor wprowadzonych do podłoża a liczbą mikrocząstek. Jednak wszystkie doniesienia literaturowe

na temat wpływu stężenia mikrocząstek na przebieg hodowli typu MPEC łączy identyczna liczba spor wprowadzanych do podłoża i jest to 10^9 l^{-1} . W ten sposób jedyną zmienną pozostaje ilość mikrocząstek. Sprawia to, że poniżej przedstawione dane są ze sobą stosunkowo łatwo porównywalne. Zatem w przypadku wytwarzania β -fruktofuranozydazy przez *Aspergillus niger* SKAn1015 optymalnym stężeniem mikrocząstek talku o średnicy $6 \mu\text{m}$ jest 10 g l^{-1} , a aktywność β -fruktofuranozydazy jest ponad 3-krotnie wyższa w porównaniu do kontroli bez mikrocząstek (rys. 5.4a). *Aspergillus terreus* ATCC 20542 najwydajniej (2-krotnie więcej niż w hodowli kontrolnej) wytwarza lowastatynę (rys. 5.4b), jeżeli w prekulturze znajdują się mikrocząstki talku o średnicy $10 \mu\text{m}$ i stężeniu 12 g l^{-1} (Gonciarz i Bizukojć, 2014). Nieco większe stężenie mikrocząstek talku i tlenku glinu (15 g l^{-1}) jest optymalne dla wytwarzania fitazy (rys. 5.4c) przez *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 (Coban *et al.*, 2015). *Rhizopus oryzae* NRRL 395 wytwarza najwydajniej kwas mlekowy przy stężeniu mikrocząstek talku na poziomie 10 g l^{-1} , a tlenku glinu 15 g l^{-1} (rys. 5.4g). Wartości te są zbliżone do tych dla grzybów z rodzaju *Aspergillus*, pomimo tego że *Rhizopus oryzae* NRRL 395 należy do grzybów niższych klasy *Zygomycetes* (Coban i Demirci, 2016). Dla *Mortierella isabelina*, który także należy do klasy *Zygomycetes*, dodatek mikrocząstek talku od $0,1$ do 10 g l^{-1} wywołuje podobne efekty. Maksymalna wydajność produktu (lipidów) pojawia się pomiędzy 6 i 10 g l^{-1} talku (Gao *et al.*, 2014). Jedynie dla *Aspergillus sojae* AsT1 wytwarzającego β -mannanazę (rys. 5.5h) nie uzyskano wyraźnej wartości optymalnego stężenia mikrocząstek talku, zaś dla tlenku glinu była to niższa wartość na poziomie 5 g l^{-1} (Yatmaz *et al.*, 2016). Interesujące jest również to, że w przypadku grzybów, których hodowlę wgłębną ze względu na słabe wytwarzanie bezpłciowych spor lub ich fizjologiczny brak (*Basidiomycetes*) rozwija się ze zhomogenizowanej grzybni rosnącej powierzchniowo, czyli rozdrobnionych strzępek, optymalne stężenia mikrocząstek są dość podobne. I tak dla *Caldariomyces fumago* DSM 1256 optymalne stężenie talku wynosi 10 g l^{-1} talku i 15 g l^{-1} tlenku glinu (rys. 5.4f). W przypadku podstawczaków dla *Cerrena unicolor* (Bull. ex Fr.) Murr strain 137 jest to około 15 g l^{-1} , ale także dla wyższych stężeń mikrocząstek tlenku glinu nie obserwuje się spadku aktywności lakkazy przynajmniej w 9 dniu hodowli (rys. 5.4e). Trochę inaczej jest dla *Pleurotus sapidus* DSM 8266, bo tutaj najwyższą aktywność obserwuje się przy 30 g l^{-1} tlenku glinu (Antecka *et al.*, 2016). Natomiast w przypadku innych niż talk i tlenek glinu mikrocząstek jak krzemian tytanu ($8 \mu\text{m}$) optymalne stężenie dla produkcji β -fruktofuranozydazy przez *Aspergillus niger* SKAn1015 i α -glukoamylazy przez *Aspergillus niger* AB1.13 jest wyższe i wynosi 25 g l^{-1} (rys. 5.4d). Wynika to z odmiennego charakteru tych mikrocząstek i innego ich oddziaływania na morfologię grzybni, o czym będzie mowa w rozdziale 5.2.2.3.



Rys. 5.4. Wpływu stężenia mikrocząstek m ineralnych w hodowlach typu MPEC na: (A) aktywność β -fruktofuranazydazy, *Aspergillus niger* SKAn1015, (B) stężenie lowastatyny, *Aspergillus terreus* ATCC 20542 (C) aktywność fitazy, *Aspergillus ficum* NRRL 3135, (D) aktywność β -fruktofuranazydazy i α -glukoamylazy *Aspergillus niger* SKAn1015 i *Aspergillus niger* AB1.13, (E) laktazy, *Cerrena unicolor* (Bull. ex Fr.) Murr strain 137, (F) chloroperoksydazy *Caldariomyces fumago* DSM 1256, (G) kwasu mlekowego *Rhizopus oryzae* NRRL 395 oraz (H) β -mannanazy *Aspergillus sojae* AsT1

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z Kaup *et al.* (2008), Driouch *et al.* (2010), Driouch *et al.* (2012), Gonciarz i Bizukojć (2014), Coban *et al.* (2015), Antecka *et al.* (2016), Coban i Demirci (2016), Yatmaz *et al.* (2016).

Mikrocząstki nieczęsto były stosowane wobec promieniowców. Jedynym takim przykładem w literaturze jest użycie bardzo dużych szklanych kulek o średnicy 0,5 mm do głębokiej hodowli *Streptomyces hygroscopicus* var *geldanus* NRRL 3602 w zakresie od 0 do 55 kulek na 100 ml podłoża. Zwrócić tu należy uwagę, że tak duże mikrocząstki nie oddziaływały w sposób pożądaný na spory grzybów strzępkowych. Jednak średnica peletek *Streptomyces hygroscopicus* var *geldanus* NRRL 3602 pod wpływem tychże kulek zmniejszyła się od około 200 μm do 125 μm dla największej zawartości szklanych kulek, co jest wynikiem dość przeciętnym. Należy jednak pamiętać, że peletki promieniowców już z natury bez stosowania MPEC są mniejsze od tych tworzonych przez grzyby strzępkowe. Liczebność peletek na objętość podłoża w tym samym zakresie mocno wzrosła od około 3000 ml^{-1} do ponad 10000 ml^{-1} . Jednocześnie uzyskano 88% wzrost wydajności biosyntezy geldanamycyny dla 55 kulek w 100 ml podłoża (Dobson *et al.*, 2008).

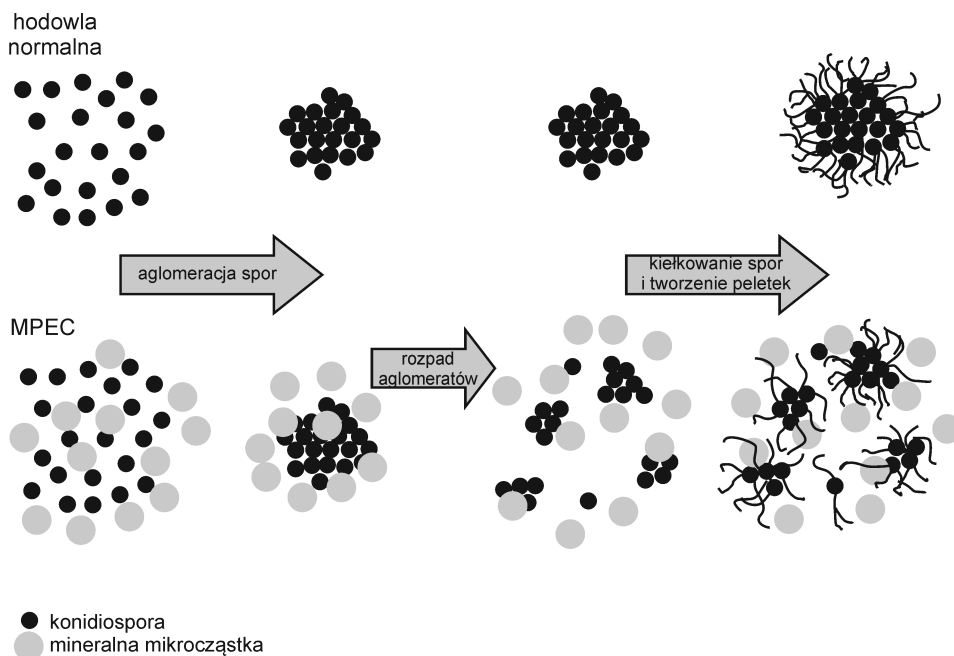
5.2.2.2. Mechanizm działania mikrocząstek

Mechanizm działania mikrocząstek nie jest jeszcze w pełni poznany, brakuje przede wszystkim opisu ilościowego. Ale już przy pierwszym w historii zastosowaniu MPEC w hodowli wstrząsanej badacze starali się wyjaśnić, dlaczego zmienia się morfologia grzybni. Dotyczyło to grzyba, który nie wytwarzał spor *Caldariomyces fumago* DSM 1256. Efekt działania mikrocząstek można przypisać zderzeniom komórki grzybni-mikrocząstka oraz naprężeniom ścinającym związanym z energią dostarczaną poprzez ruch obrotowy wytrząsarki. Również zawieszone mikrocząstki mogą przeszkadzać we wzajemnych oddziaływaniach między strzępkami. Dlatego właśnie zbyt duże mikrocząstki (500 μm) są nieskuteczne, bo nie mogą właściwie osłaniać aglomerujących się strzępek. Dodatkowo istotne jest to, że na małych mikrocząstkach (<42 μm) immobilizacja grzybni na nich samych jest niemożliwa (Kaup *et al.*, 2008).

Driouch *et al.* (2010a), przeprowadziwszy szczegółowe obserwacje mikroskopowe wzrostu *Aspergillus niger* SKAn1015, zaproponowali następujący werbalny opis oddziaływania mikrocząstek na konidiospory, który został zwizualizowany na rys. 5.5. Konidiospory grzybów z rodzaju *Aspergillus* mają silną zdolność agregacji w hodowlach głębných, o czym była już mowa wcześniej. W podłożach bez obecności mikrocząstek duże agregaty konidiospor utrzymują się przez kilka godzin zanim dojdzie do procesu ich kiełkowania. Te duże aglomeraty po wykiełkowaniu spor pozostają niezmienione przez kilka kolejnych godzin, a rosnące promieniście strzępki tworzą coraz większą peletkę. Zwykle proces trwa kilkanaście godzin zanim uformuje się zwarta kulista peletka o średnicy nawet kilku milimetrów, zależnie od użytej liczby konidiospor. Kiedy jednak w zawieszynie kiełkujących konidiospor znajdują się mikrocząstki mineralne, w przypadku tych badań były to mikrocząstki talku, początkowa faza agregacji konidiospor ulega silnemu zakłóceniu. Duże aglomeraty konidiospor ulegają rozpadowi i już po dwóch godzinach są obserwowane nawet pojedyncze konidiospory w podłożu. Mniejsze aglomeraty konidiospor rozwijają się następnie

w mniejsze peletki, w skrajnych przypadkach może nawet dojść do utworzenia grzybni o morfologii rozproszonej po kilkunastu godzinach jej wzrostu. Istotne jest to, że oddziaływanie mikrocząstek mineralnych z konidiosporami zachodzi na bardzo wczesnym etapie rozwoju grzybni, a dodatek mikrocząstek w późniejszych godzinach hodowli, kiedy zaglomerowane i wykiełkowane konidiospory zaczęły już tworzyć peletki nie daje żadnych efektów. Za oddziaływaniem mikrocząstek ze sporami grzybni stoją najprawdopodobniej mechanizmy chemiczne i fizyczne (Driouch *et al.*, 2010a).

Należy jednak podkreślić, że do tej pory nikt nie przedstawił żadnego ilościowego procesu wzrostu grzybni w obecności mikrocząstek. Nie ma też żadnych równań korelacyjnych pomiędzy wielkością aglomeratów, a stężeniem mikrocząstek, ani też opisu zmian wielkości aglomeratów oraz szybkości tych zmian w czasie (kinetyka wzrostu grzybni w hodowli typu MPEC).



Rys. 5.5. Wizualizacja oddziaływania mineralnych mikrocząstek na konidiospory grzybów z rodzaju *Aspergillus*

Źródło: opracowanie własne na podstawie opisu w Driouch *et al.* (2010a) i własnych obserwacji.

5.2.2.3. Efekty oddziaływania mikrocząstek na mikroorganizmy strzępkowe

Niezaprzeczalne jest to, że zastosowanie mikrocząstek może prowadzić do zwiększenia wydajności wytwarzania enzymów i metabolitów wtórnych, co zostało pokazane w rozdziale 5.2.2.1 w zależności od rodzaju, wielkości i stężenia zastosowanych mikrocząstek. To jest oczywiście ten najważniejszy pozytywny efekt prowadzenia hodowli typu MPEC. Ale ten przyrost wydajności

nie bierze się znikąd i jest ściśle powiązany z efektami biologicznymi i procesowymi wywołanymi przez mikrocząstki. Przyjrzyjmy się zatem dokładniej efektom zastosowania hodowli typu MPEC.

Przede wszystkim zastosowanie MPEC prowadzi do zmiany formy morfologicznej grzybni. Niejako motywacją zastosowania dodatku mikrocząstek do hodowli mikroorganizmów strzępkowych było pozbycie się często kłopotliwych w hodowlach bioreaktorowych z powodów przedstawianych we wcześniejszych rozdziałach makroskopowych kilkumilimetrowych peletek. Oddziaływanie mikrocząstek ze sporami czy strzępkami we właściwym momencie hodowli (*vide*: rozdz. 5.2.2.2) powoduje przede wszystkim zmniejszenie wielkości peletek grzybni. Średnia średnica wytworzonych w ten sposób peletek znacząco maleje. Czasami nawet następuje przejście grzybni w formę morfologii rozproszonej. Tym zmianom morfologii grzybni przypisuje się zwiększenie wydajności wytwarzania enzymów czy metabolitów wtórnych. Do tej pory MPEC stosowano w szerszym zakresie prawie wyłącznie do grzybów z rodzaju *Aspergillus* i innych grzybów o koagulacyjnym mechanizmie tworzenia peletek.

Tabela 5.5. Zmiany morfologii mikroorganizmów strzępkowych w hodowlach typu MPEC

Mikroorganizm	Numer DSM	Klasa	Wielkość peletek (mm)		Produkty metabolizmu	Obecność wolnych strzępek
			Kontrola	MPEC		
<i>Penicillium digitatum</i>	62840	<i>Ascomycetes</i>	5-60	0,2-1,2	enzymy	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	848	<i>Ascomycetes</i>	2-60	0,1-3	penicylina	++
<i>Emericella nidulans</i>	820	<i>Ascomycetes</i>	1-3	0,05-0,2	kwas cholowy	++
<i>Aspergillus niger</i>	821	<i>Ascomycetes</i>	3-8	0,1-1,5	kwas cytrynowy, kwas szczawiowy	+
<i>Acremonium chrysogenum</i>	880	<i>Ascomycetes</i>	1-10	0,1-0,7	cefalosporyny	+
<i>Pleurotus sapidus</i>	8266	<i>Basidiomycetes</i>	~30	0,1-0,3	enzymy	+
<i>Rhizopus oryzae</i>	907	<i>Zygomycetes</i>	~80	1-5	sterydy	+
<i>Chaetomium globosum</i>	1962	<i>Ascomycetes</i>	1-5	0,2-3,5	celulazy	+
<i>Caladariomyces fumago</i>	1256	<i>Ascomycetes</i>	~4	0,1-0,5	chloroperoksydaza	++
<i>Streptomyces aureofacies</i>	40127	<i>Actinomycetes</i>	0,9-2,1	0,06-0,5	chlorotetracyklina	+

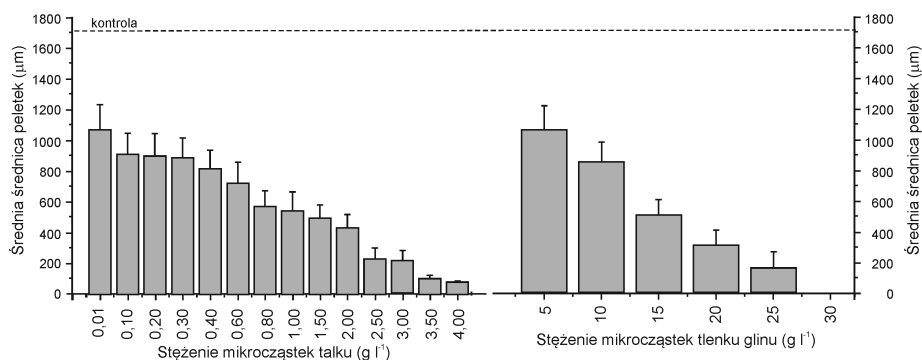
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Kaup *et al.* (2008).

W każdej dotychczasowej publikacji na temat MPEC określano w sposób ilościowy zmianę morfologii grzybni przez pomiar wielkości peletek w hodowlach bez i z mikrocząstkami. Prawdopodobnie wpływ zastosowania MPEC na morfologię grzybni zależy od gatunku mikroorganizmu, ale szczegółowych danych na ten temat nadal brakuje. Jak wcześniej wspomniano głównym obiek-

tem badań były grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Tylko Kaup *et al.* (2008) przedstawili bardzo wstępne i ogólne wyniki badań nad 9 różnymi gatunkami mikroorganizmów strzępkowych pochodzących z kolekcji DSM (tabela 5.5). Na podstawie tej tabeli widać wyraźnie, że dodatek mikrocząstek, niezależnie od gatunku mikroorganizmu strzępkowego, zmniejsza wielkość utworzonych aglomeratów (peletek).

Najwięcej danych ilościowych dotyczących wpływu dodatku mikrocząstek na wielkość peletek można znaleźć tylko dla tych szczepów, które były badane w hodowlach typu MPEC zarówno w kolbach wstrząsanych, jak i w bioreaktorach zbiornikowych mieszadłowych, a więc dla *Aspergillus niger* SKAn1015, *Aspergillus niger* AB.1.13, *Aspergillus terreus* ATCC 20542, *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 oraz *Mortierella isabelina* NRRL 1757.

To, jaką formę morfologiczną przyjmie badanych grzyb strzępkowy w hodowlach typu MPEC, zależy przede wszystkim od stężenia mikrocząstek. Na rys. 5.6 został przedstawiony wpływ stężenia mikrocząstek talku i tlenku glinu na średnie średnice peletek *Aspergillus niger* SKAn1015 na podstawie pomiarów 100 peletek z hodowli wstrząsanej w 72 godzinie procesu. Zaledwie 4 g l⁻¹ talku powoduje zmniejszenie wielkości peletek prawie o rząd wielkości z 1700 µm do poniżej 200 µm, czyli peletki makroskopowe stają się peletkami mikroskopowymi. Co więcej, przy stężeniu tlenku glinu na poziomie 30 g l⁻¹ grzybnia *Aspergillus niger* SKAn1015 przechodzi w formę rozproszoną.

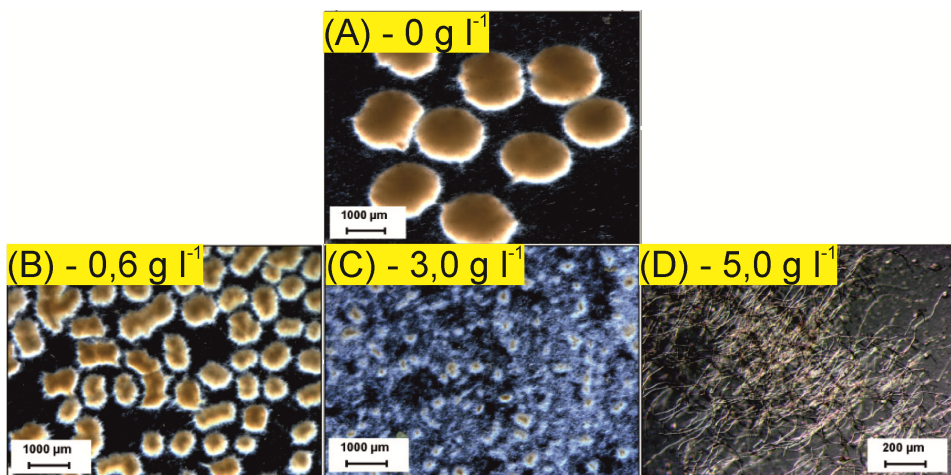


Rys. 5.6. Wpływ stężenia mikrocząstek talku i tlenku glinu na wielkość peletek *Aspergillus niger* SKAn10; linia przerywana oznacza hodowlę bez mikrocząstek

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Driouch *et al.*, 2010a.

Należy także zwrócić uwagę, że od rodzaju mikrocząstek zależy to, jakie stężenie mikrocząstek będzie skuteczne, by uzyskać pożądaną wielkość peletek. Widać wyraźnie, że dla podobnego efektu trzeba użyć więcej mikrocząstek tlenku glinu. Przede wszystkim wynika to z różnic średniej wielkości i rozkładu wielkości komercyjnie dostępnych mikrocząstek. Porównanie wyglądu grzybni *Aspergillus niger* SKAn1015 w hodowli MPEC i hodowli kontrolnej zależnie od stężenia mikrocząstek talku jest pokazane na rys. 5.7. Na rys. 5.7d

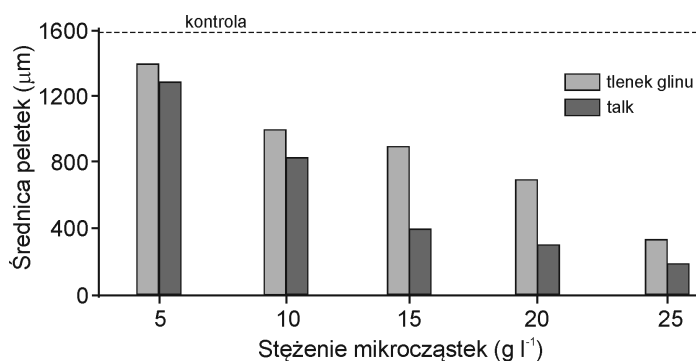
widać wyraźnie rozproszoną morfologię grzybni przy stężeniu mikrocząstek talku na poziomie 5 g l^{-1} oraz morfologię mieszaną (małe peletki i strzępki jednocześnie) na rys. 5.7c.



Rys. 5.7. Zmiany morfologii grzybni *Aspergillus niger* SKAn1015 w 72 godzinie wstrząsanej hodowli wglębnej typu MPEC z mikrocząstkami talku ($6 \mu\text{m}$) o stężeniu: (A) 0 g l^{-1} , (B) $0,6 \text{ g l}^{-1}$, (C) $3,0 \text{ g l}^{-1}$ oraz (D) $5,0 \text{ g l}^{-1}$

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych fragmentów z: Driouch *et al.*, (2010a).

Zwiększenie stężenia mikrocząstek talku dla tego szczepu również powodowało pewną zmianę kształtu peletek. Widać, że peletki odbiegają od idealnie sferycznego kształtu (rys. 5.7b). O wpływie wielkości mikrocząstek na wielkość uzyskanych peletek świadczy to, że zastosowanie nieco większych mikrocząstek talku ($15 \mu\text{m}$ zamiast $6 \mu\text{m}$) przy jednakowym stężeniu mikrocząstek na poziomie 10 g l^{-1} prowadzi do uzyskania mniejszych peletek (Driouch *et al.*, 2010a).



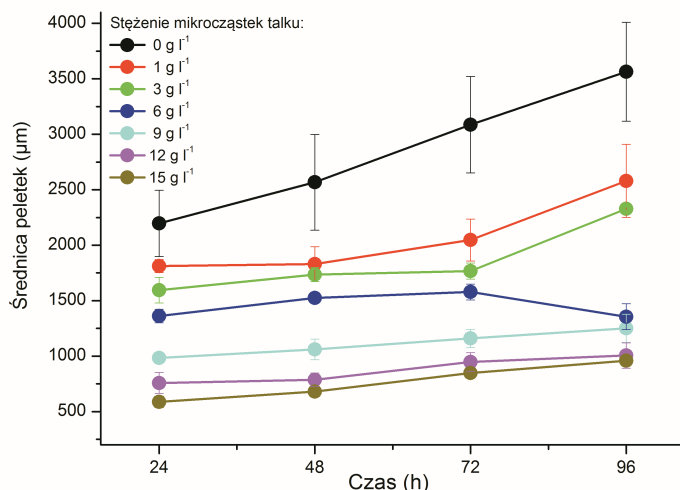
Rys. 5.8. Wpływ stężenia mikrocząstek talku i tlenku glinu na wielkość peletek *Aspergillus ficcum* NRRL 3135

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Coban *et al.* (2015).

Mikrocząstki tlenku glinu oraz talku w podobny sposób oddziałują na *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 (rys. 5.8). Następuje wyraźny spadek ich średnicy z około 1600 μm do około 200 μm przy stężeniu talku na poziomie 25 g l^{-1} . W zakresie badanych stężeń mikrocząstek nie wytworzyła się morfologia rozproszona grzybni.

Efekty zmiany morfologii grzybni dla grzyba strzępkowego należącego do klasy *Zygomycetes Mortierella isabelina* NRRL 1757, czyli zmniejszenie peletek z $0,238 \pm 0,058 \text{ mm}^2$ dla kontroli do $0,036 \pm 0,004 \text{ mm}^2$ (wielkość wyrażona jako średnie pole powierzchni rzutu peletki) dla stężenia talku na poziomie 10 g l^{-1} nie odbiega wyraznie od podobnych zależności dla grzybów z rodzaju *Aspergillus*, z tym że ten gatunek grzyba niższego wykazuje wyjątkowo aglomeracyjny mechanizm tworzenia peletek (Gao *et al.*, 2014).

Rodzaj zastosowanych różnych mikrocząstek prowadzi do uzyskania różnych form morfologicznych zależnie od warunków hodowli i gatunku grzyba strzępkowego. Może to być po prostu zmniejszenie wielkości aglomeratów (peletek) aż do przejścia grzybni do morfologii rozproszonej. Dodatkowo może następować zmiana struktury peletek oraz kinetyki ich wzrostu. Również nieco inny efekt może mieć zastosowanie mikrocząstek w hodowlach dwuetapowych prekultura-podłoże produkcyjne, w których za inokulum służą już uformowane peletki, co oczywiście, poddane działaniu mikrocząstek (Gonciarz *et al.*, 2012). Szczegółowe badania na ten temat były prowadzone dla *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Na rys. 5.9 przedstawiono wpływ dodatku mikrocząstek talku do prekultury (od 0 g l^{-1} do 15 g l^{-1} , hodowla wstrząsana; tą prekulturą zaszczepiono podłoże produkcyjne) na zmiany średnicy peletek w czasie w podłożu produkcyjnym (hodowla wstrząsana).



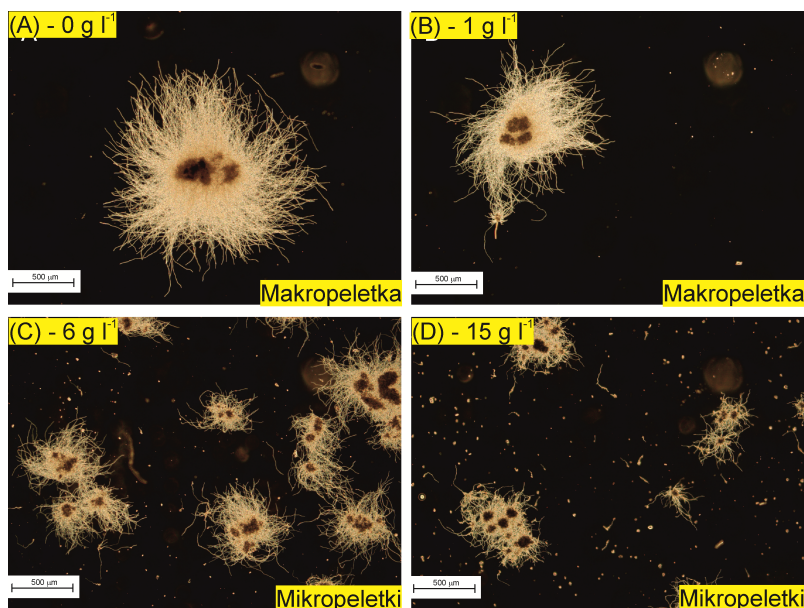
Rys. 5.9. Wpływ stężenia mikrocząstek dodawanych do prekultury na zmiany wielkości peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 w czasie w podłożu produkcyjnym (hodowla wstrząsana)

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Gonciarz i Bizukojć (2014).

Mikrocząstki, oprócz tego, że powodują zmniejszenie wielkości peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 w każdej godzinie procesu, to jeszcze znacząco wpływają na kinetykę wzrostu peletek. Szybkość wzrostu peletek wyrażona ilościowo zmianą ich średnicy jest mniejsza w hodowlach z mikrocząstkami niż bez nich. W ciągu 4 dób w kontroli bez talku średnice peletek powiększyły się o ponad 1000 μm z około 2250 μm do około 3500 μm , zaś w hodowlach z talkiem (powyżej 9 g l^{-1}) przyrost ten nie był większy niż 200 μm .

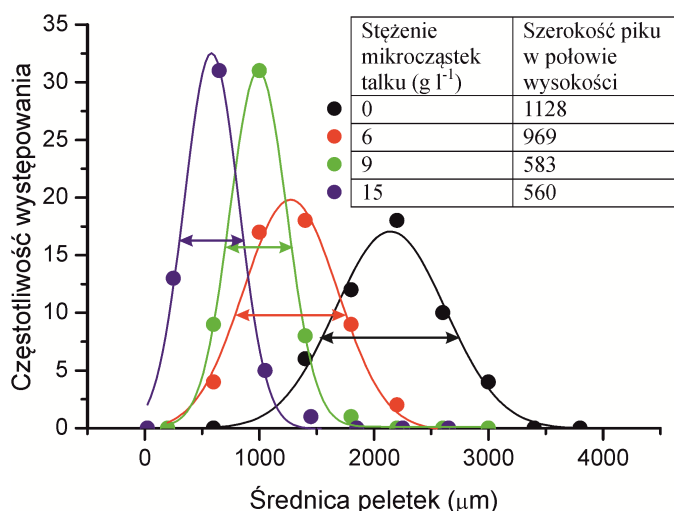
Oczywiście ten efekt zmniejszenia szybkości wzrostu peletek w podłożu produkcyjnym wynika z wielkości i struktury uzyskanych peletek w prekulturze, co widać wyraźnie na rys. 5.10. Należy jednak zwrócić uwagę, że w kulturze wstrząsanej w podłożu produkcyjnym peletki pozostały ostatecznie peletkami znajdującymi się na umownej granicy peletek mikro- i makroskopowych (średnica około 500 μm) i nie uzyskano w tych warunkach wyraźnych mikropeletek, ani grzybni o morfologii rozproszonej.

Zmiany wielkości peletek to tylko jeden z efektów oddziaływania mikrocząstek. Dodatkowo okazuje się, że oddziaływanie mikrocząstek stabilizuje wielkość peletek i ich strukturę. Dowodem na to są rozkłady wielkości peletek w dwuetapowych hodowlach wstrząsanych *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Rozkład wielkości średnic peletek opisywany jest rozkładem normalnym Gaussa. Jednak szerokość rozkładu, wyrażająca zmienność średnic w badanej populacji peletek znacząco się różni w MPEC w porównaniu do zwykłych hodowli. Im więcej mikrocząstek, tym średnice uzyskanych peletek są bardziej zbliżone do siebie (rys. 5.11).



Rys. 5.10. Peletki *Aspergillus terreus* ATCC 20542 w 24 godzinie hodowli w prekulturze (służącej później do inokulacji podłoża produkcyjnego) uzyskane przy różnych stężeniach mikrocząstek talku: (A) kontrola 0 g l^{-1} , (B) 1 g l^{-1} , (C) 6 g l^{-1} i (D) 15 g l^{-1}

Źródło: opracowanie własne na podstawie obrazów z: Gonciarz i Bizukojć (2014).

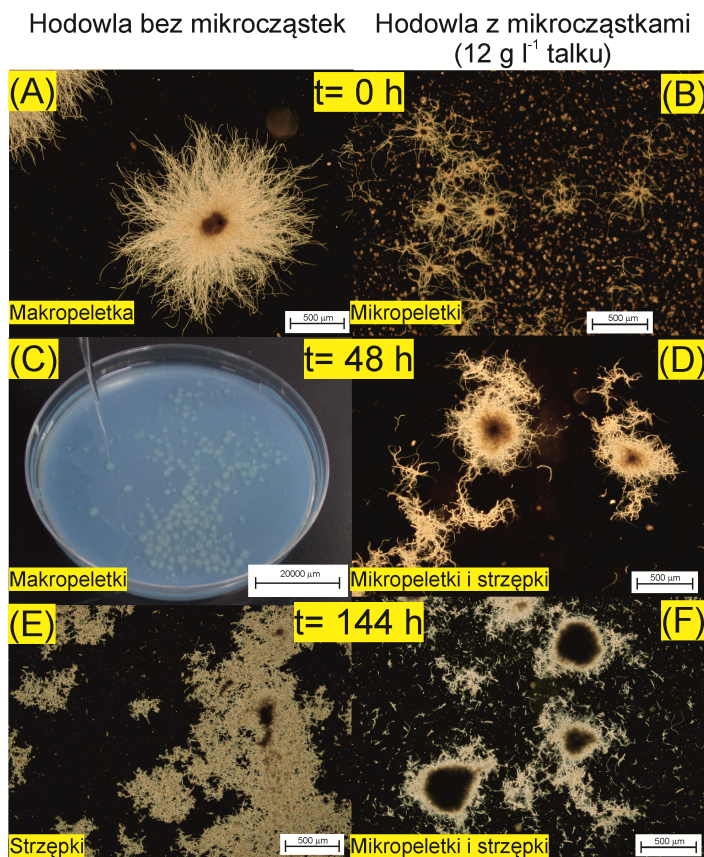


Rys. 5.11. Rozkład wielkości peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 w hodowlach typu MPEC

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z: Gonciarz i Bizukojć, (2014).

W bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym dwuetapowa hodowla *Aspergillus terreus* ATCC 20542 typu MPEC przebiegała nieco inaczej. Podobnie 24-godzinna prekultura z hodowli wstrząsanej z mikrocząstki talku lub bez służyła do inokulacji bioreaktora (rys. 5.12a i 5.12b). Widać tu wyraźnie różnicę w obu inokulach. Ostatecznie jednak zmiany morfologiczne grzybni okazały się jeszcze bardziej złożone ze względu na nałożenie się efektu naprężeń mechanicznych oddziałujących na peletki w bioreaktorze na efekt mikrocząstek działających na grzybnię w prekulturze.

Analizując rys. 5.12c, można zauważyć, że w hodowli normalnej bez mikrocząstek w trofofazie (48 godzina procesu) tworzą się makroskopowe peletki o średnicach rzędu 2000-3000 μm . Jednakże w późnej idiofazie (144 godzina procesu) grzybnia *Aspergillus terreus* ATCC 20542 przechodzi do formy rozproszonej (rys. 5.12e). Przyczyną tej zmiany morfologii są naprężenia mechaniczne, które spowodowały destrukcję peletek. Niejako zadziałała tu tradycyjna technika inżynierii morfologicznej. Przy zastosowaniu MPEC w ogóle nie pojawiły się peletki makroskopowe (rys. 5.12d). Mikrocząstki pozwoliły na ustabilizowanie struktury grzybni w formie mikropeletek, które dotrwały jako „ogolone” mikropeletki do późnej idiofazy pomimo silnych naprężeń mechanicznych (rys. 5.12f). Tutaj także nie pojawia się przejście do pełnej morfologii rozproszonej, chociaż występowały wolne strzępki w zawiesinie powstałe pod wpływem mikrocząstek i, co szczególnie istotne, naprężeń mechanicznych.

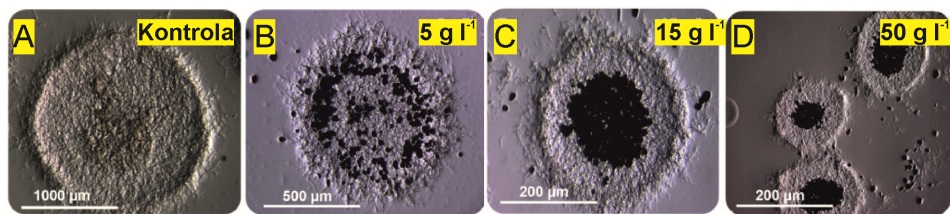


Rys. 5.12. Zmiany w czasie morfologii *Aspergillus terreus* ATCC 20542 w bioreaktorowej hodowli normalnej i typu MPEC (mikrocząstki talku ~10 μm): owłosione peletki w prekulturze bez (A) i z (B) z dodatkiem mikrocząstek, sferyczne makroskopowe peletki w hodowli bez mikrocząstek (C) oraz mikroskopowe mocno owłosione peletki w hodowli z mikrocząstkami, występuje również trochę wolnych strzępek (D), zmienione pod wpływem naprężeń mechanicznych peletki (grzybnia rozproszona) w hodowli bez mikrocząstek (E) oraz mikroskopowe „ogolone” peletki wraz z wolnymi strzępkami w hodowli z mikrocząstkami (F)

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Gonciarz *et al.* (2016).

Powyżej opisane zmiany morfologii grzybni pod wpływem oddziaływania mikrocząstek pozostawały dość typowe. Peletki makroskopowe ulegały zmniejszeniu, czasem stając się peletkami mikroskopowymi lub też przechodząc w formę rozproszoną. Jednak mogą się zdarzyć szczególne przypadki, w których forma morfologiczna grzybni może stać się zupełnie odmienna od tych znanych z konwencjonalnych hodowli grzybów strzępkowych, a nawet wyżej opisanych procesów MPEC z użyciem talku czy tlenku glinu. Czynnikiem powodującym nietypową zmianę morfologii może być rodzaj użytych mikrocząstek. Zastosowanie krzemianu tytanu wobec *Aspergillus niger* SKAn1015 i *Aspergillus niger* AB1.13 powoduje powstanie zupełnie nowej formy morfologicznej grzybni

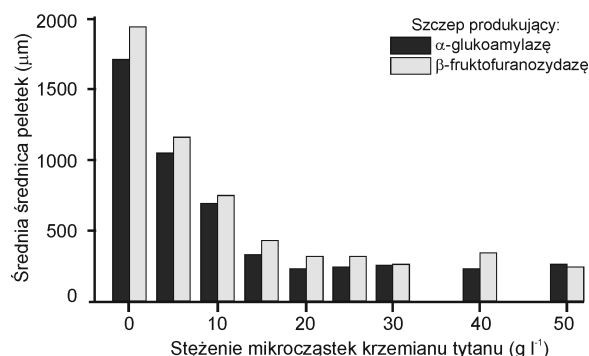
nazwanej strukturą *core-shell*, co można przetłumaczyć na język polski jako „jądro-skorupka” (Driouch *et al.*, 2012). W tym przypadku zaobserwowano wbudowanie mikrocząstek do wnętrza peletki, przez co powstało mineralne jądro. I to mineralne jądro obrastało strzępkami. Wielkość i kształt takiego jądra i, co oczywiste, samej peletki zależy od stężenia wprowadzonych mikrocząstek krzemianu tytanu (rys. 5.13).



Rys. 5.13. Wpływ mikrocząstek krzemianu tytanu o średnicy $\sim 8 \mu\text{m}$ na morfologię grzybní *Aspergillus niger* SKAn1015 we wglębnej kulturze wstrząsanej po 72 h hodowli: 0 g l^{-1} (A), 5 g l^{-1} (B), 15 g l^{-1} (C) i 50 g l^{-1} (D)

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z: Driouch *et al.* (2012).

Pomimo zmiany struktury peletek ich wielkość w zależności od stężenia mikrocząstek krzemianu tytanu zmieniała się dość typowo, malejąc od około 1700–2000 μm do stałej wielkości około 250 μm dla stężenia mikrocząstek 20 g l^{-1} i więcej dla obu badanych szczepów *Aspergillus niger* SKAn1015 oraz *Aspergillus niger* AB1.13 (rys. 5.14).

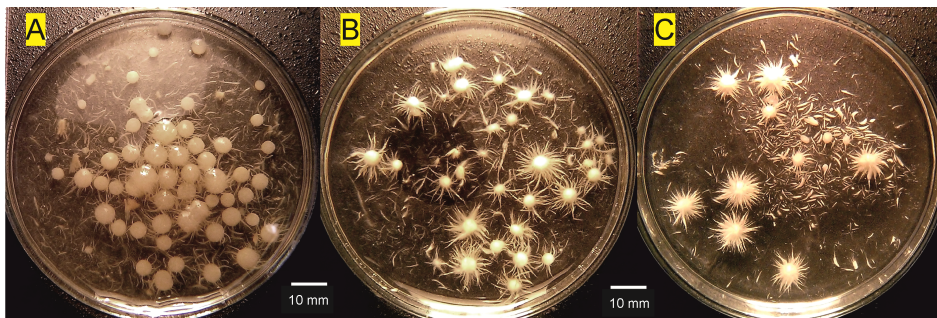


Rys. 5.14. Wpływ stężenia mikrocząstek krzemianu tytanu na wielkość peletek grzybów *Aspergillus niger* SKAn105 (produkcja β -fruktofuranozydazy) oraz mutantu *Aspergillus niger* AB1.13 (produkcja α -glukoamylazy) wyposażonego w gen zielonej fluorescencji do celów analitycznych

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Driouch *et al.* (2012).

Jeszcze bardziej nietypowa zmiana morfologii pod wpływem mikrocząstek dotyczy niektórych podstawczaków (rys. 5.15). Należy tu przypomnieć, że hodowla wglębna grzybów należących do tej klasy musi być zawsze rozwijana ze

zhomogenizowanych strzępek, gdyż podstawczaki nigdy nie wytwarzają bezpłciowych spor.



Rys. 5.15. Nietypowa zmiana formy makromorfologicznej podstawczaka *Cerrena unicolor* (Bull. ex Fr.) Murr strain 137 pod wpływem mikrocząstek tlenku glinu: (A) 0 g l^{-1} , (B) 15 g l^{-1} oraz (C) 30 g l^{-1}

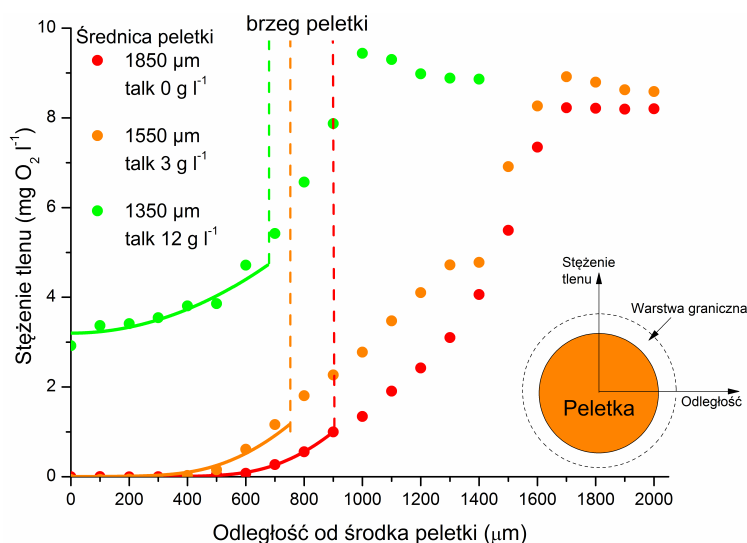
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Anteck *et al.* (2016).

W przypadku *Cerrena unicolor* (Bull. ex Fr.) Murr strain 137 dodatek 15 g l^{-1} tlenku glinu powoduje przemianę zwykłych sferycznych lekko owłosionych peletek do nietypowej, aczkolwiek bardzo charakterystycznej gwiazdистой struktury aglomeratów.

Wszystkie opisane powyżej zmiany morfologii grzybni pociągały za sobą takie zmiany warunków wzrostu w hodowlach, że zawsze obserwowano wzrost stężenia wytwarzanych metabolitów oraz aktywności wydzielanych enzymów. Odpowiedzi na pytanie, dlaczego tak się działo, próbowali udzielić autorzy tych wszystkich doniesień literaturowych.

Zmniejszenie wielkości peletek pod wpływem mikrocząstek lub też nawet przejście do morfologii rozproszonej polepsza zdecydowanie dostęp tlenu do strzępek i ten efekt oddziaływania mikrocząstek jest uważany za najważniejszą przyczynę zwielokrotnienia aktywności enzymów oraz stężenia metabolitów w hodowlach typu MPEC. Na efekt ten powołują się wszyscy badacze, którzy zastosowali mikrocząstki w hodowli grzybów strzępkowych (Kaup *et al.*, 2008; Driouch *et al.*, 2010, Driouch *et al.* 2012, Gonciarz i Bizukojć, 2014; Coban *et al.*, 2015; Gonciarz *et al.*, 2016; Anteck *et al.*, 2016; Coban i Demirici, 2016), chociaż często nie pokazują oni na to ani bezpośrednich, ani pośrednich dowodów. Za polepszenie dostępu tlenu do strzępek grzybni w hodowlach MPEC odpowiada przede wszystkim zmiana warunków dyfuzyjnego transportu tlenu w peletkach. Krótsza droga dyfuzji przekłada się na efektywniejszy transport masy i wyższe stężenie tlenu głębiej w peletkach. O tym jakie opory dyfuzyjnego ruchu tlenu mogą się pojawiać w peletkach grzybów strzępkowych świadczy to, że pełna penetracja takiej struktury tlenem może zachodzić tylko do głębokości $410 \mu\text{m}$. Wartość tę wyznaczono dla *Aspergillus niger* AB 1.13. (Hille *et al.*, 2005), ale może być ona jeszcze mniejsza w zależności od gatunku grzyba i warunków jego hodowli.

Najlepszym bezpośrednim dowodem na to, jak polepszają się warunki dyfuzji tlenu w peletkach jest wyznaczenie profilu stężenia tlenu wewnątrz peletki za pomocą mikroelektrody tlenowej (Gonciarz i Bizukojć, 2014), co zostało dokonane dla peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 pochodzących z dwuetapowej hodowli wstrząsanej. Na kształt profilu stężenia tlenu w peletkach znacząco wpływa wielkość peletek (mikrocząstki w oczywisty sposób zmieniają tę właściwość grzybni), ale także ich wewnętrzna struktura (gęstość strzępek), która jest zależna zarówno od wieku hodowli, ale, jak się również okaże, od dodatku mikrocząstek. Na przykład w pojedynczych peletkach uzyskanych w 72 godzinie (aktywność grzybni jest wtedy największa) hodowli *Aspergillus terreus* ATCC 20542 bez mikrocząstek niezerowe stężenie tlenu było obserwowane do głębokości tylko około 200 μm dla peletki o średnicy 1850 μm (rys. 5.16). Efektywny z punktu widzenia średnicy peletek dodatek mikrocząstek (3 g l⁻¹ talku i zmniejszenie średnicy do 1550 μm) nieznacznie wpływa na wewnętrzną strukturę peletki i dyfuzję tlenu. Jednak większa ilość mikrocząstek talku (12 g l⁻¹) może sprawić, że stężenie tlenu w peletce będzie wyższe od zera nawet w całej makroskopowej peletce o średnicy 1350 μm . Oznacza to możliwość dyfuzji tlenu do głębokości prawie 700 μm , co potwierdza zmiana struktury strzępek grzybni. Mikrocząstki talku powodują wzrost efektywnego współczynnika dyfuzji w peletkach *Aspergillus terreus* ATCC 20542 średnio z około 1000 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ do około 2500 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Gonciarz i Bizukojć, 2014).



Rys. 5.16. Zmiany profili stężenia tlenu (pomiaru wykonano w warunkach braku przepływu podłoża) wewnątrz peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 hodowanych w kolbach wstrząsanych (72 godzina hodowli) w wyniku zastosowania mikrocząstek talku w prekultury; linie ciągłe są krzywymi modelowymi uzyskanymi w wyniku rozwiązania równania bilansu tlenu dla biokatalizatora sferycznego przy przyjęciu kinetyki Michaelisa-Menten (równ. 4.30 i 4.31)

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z: Gonciarz i Bizukojć, (2014).

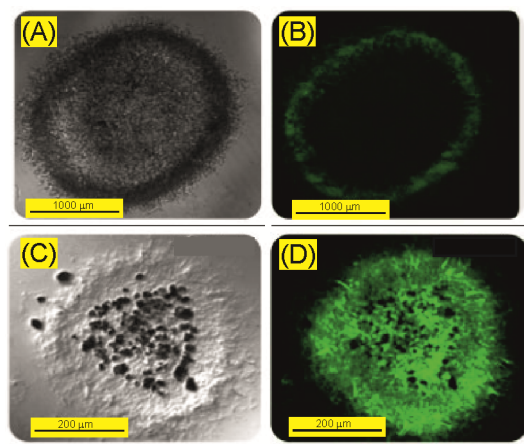
Należy jeszcze dodać, że w efekcie lepszej penetracji tlenem peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 substrat węglowy, którym w tych badaniach była laktoza, był znacznie szybciej asymilowany. A zatem, ta kaskada efektów zastosowania mikrocząstek: zmiana morfologii, lepszy dostęp tlenu do peletek, szybsze wykorzystanie substratu węglowego, ostatecznie przełożyło się na dwukrotny wzrost stężenia produkowanego metabolitu lowastatyny (Gonciarz i Bizukojć, 2014). Niepełne wykorzystanie substratu węglowego było również obserwowane w przypadku *Mortierella isabelina* NRRL 1757 w konwencjonalnej hodowli wstrząsanej. Dodatek mikrocząstek talku od 0,6 g l⁻¹ do 10 g l⁻¹ sprawił, że glukoza była w pełni wykorzystana, co również przełożyło się na zwiększenie wydajności biosyntezy związków lipidowych (Gao *et al.*, 2014).

Innym pośrednim dowodem na polepszenie warunków transportu tlenu do komórek grzybni w wyniku oddziaływania mikrocząstek jest zmniejszenie wydzielania kwasów organicznych przez grzyby strzępkowe. Jest to cecha grzybów strzępkowych rodzaju *Aspergillus*, a w szczególności dotyczy to kwasu szczawowego, tworzonego z kwasu pirogronowego, którego zbyt wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe może się pojawić w warunkach deficytu tlenu (Kubicek *et al.*, 1988). I tak *Aspergillus niger* AB1.13 może nawet tworzyć do 3 g l⁻¹ kwasu szczawowego w hodowli konwencjonalnej, a w hodowli z 10 g l⁻¹ mikrocząstek talku stężenie tego kwasu spada do 0,2 g l⁻¹ (Driouch *et al.*, 2010a).

Jeszcze jednym dowodem na to, że efekt zastosowania mikrocząstek (krzemian tytanu) do hodowli grzybów strzępkowych wiąże się ze zmianą biologicznej aktywności komórek grzybni wywołanej polepszeniem warunków transportu substratu, jest przestrzenny rozkład aktywności enzymatycznej w komórkach grzybni tworzących peletkę (Driouch *et al.*, 2012). Do określenia tego rozkładu wykorzystano mutantą *Aspergillus niger* AB1.13 (wcześniej wspomniany producent α -glukoamylazy) oznaczonego jako *Aspergillus niger* ANip7-MCS-gfp2 i zawierającego dodatkowo gen zielonego białka fluorescencyjnego (*green fluorescent protein*, GFP) pod kontrolą promotora *glaA*, który jest aktywowany glukozą, maltozą lub skrobią, a hamowany ksylozą (rys. 5.17).

Aby białko fluorescencyjne zostało zsyntezowane w komórkach grzybni, niezbędne jest źródło węgla, tlen i inne składniki pokarmowe. Wizualizację tworzenia takiego znacznikowego białka przeprowadza się za pomocą laserowej mikroskopii konfokalnej. Obszar świecenia pokazuje, jak duża przestrzeń grzybni w peletce otrzymuje właściwą ilość substancji pokarmowych i tlenu, a zatem wytwarza to znacznikowe białko. Okazało się, że w układzie bez mikrocząstek krzemianu tytanu świecenie peletek o średnicy około 2000 μ m wskazywało na penetrację grzybni substancjami odżywczymi oraz tlenem, zaledwie na głębokość około 200 μ m (rys 5.18a i 5.18b). Natomiast zmniejszenie średnicy peletek oraz zmiany ich morfologii do struktury typu *core-shell* znacząco powiększały obszar fluorescencji. Już przy stężeniu 2,5-5 g l⁻¹ krzemianu tytanu na większości obszaru peletki jeszcze o średnicy ok. 2000 μ m produkcja

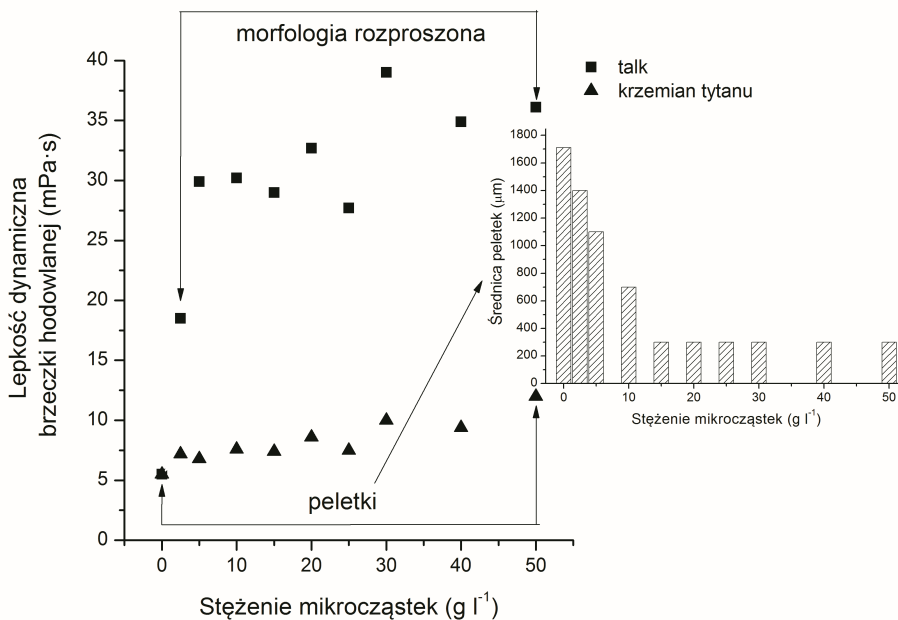
białka znacznikowego była lepsza dzięki zmianie struktury grzybni otaczającej mineralne jądro. Dla stężeń mikrocząstek ($15\text{--}25\text{ g l}^{-1}$) cała peletka o znacząco zmniejszonej średnicy, równej około $300\text{ }\mu\text{m}$, była metabolicznie aktywna (rys 5.18c i 5.18d).



Rys. 5.17. Przestrzenny rozkład produkcji zielonego białka fluorescencyjnego w peletkach rekombinowanego *Aspergillus niger* ANip7-MCS-gfp2, w hodowlach bez dodatku mikrocząstek (A) i (B) oraz z dodatkiem ($15\text{--}25\text{ g l}^{-1}$) mikrocząstek krzemianu tytanu o średnicy $8\text{ }\mu\text{m}$ (C) i (D). Ekspresja białka wywołana zasilaniem maltozą od 40 godziny hodowli, zaś obrazy wykonano za pomocą laserowej mikroskopii konfokalnej (72 godzina hodowli, przekroje o grubości $70\text{ }\mu\text{m}$ przez peletki)

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z: Driouch *et al.* (2012).

Dodatek mikrocząstek może prowadzić do utworzenia grzybni o morfologii rozproszonej (Driouch *et al.*, 2010a, Driouch *et al.*, 2012). Czasami taka forma morfologiczna jest preferowana z punktu widzenia wytwarzania bioproduktu. Jednak ta forma morfologiczna nie musi być łatwiejsza do prowadzenia procesu bioreaktorowego ze względu na zmianę właściwości reologicznych, a przede wszystkim na przyrost lepkości, zwykle nieniutonowskiej, takich zawiesin. Wtedy, to co można zyskać w polepszeniu dyfuzyjnego ruchu masy (tlenu) w peletkach czy pojedynczych strzępkach, traci się na konwekcyjnym transporcie tlenu z fazy gazowej do fazy ciekłej. Zatem, stosując MPEC, trzeba się zawsze liczyć z tym, że może nastąpić drastyczna zmiana lepkości brzeczek hodowlanych. Na rys. 5.18 przedstawiono taki efekt mikrocząstek na lepkość dynamiczną brzeczki *Aspergillus niger* SKAn1015.



Rys. 5.18. Porównanie wpływu zmiany morfologii grzybni *Aspergillus niger* SKAn1015 w wyniku zastosowania mikrocząstek talku i krzemianu tytanu na lepkość brzezki hodowlanej

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych tabelarycznych z: Driouch *et al.*, 2012.

Zachowanie formy peletek grzybni *Aspergillus niger* SKAn1015 przy zastosowaniu mikrocząstek krzemianu tytanu utrzymuje lepkość brzezki na mniej więcej stałym poziomie między 5 a 10 mPa s, czyli nie więcej niż dziesięciokrotnie wyższym od lepkości wody. Natomiast przejście peletek *Aspergillus niger* SKAn1015 w formę morfologii rozproszonej pod wpływem mikrocząstek talku sprawia, że lepkość brzezki osiąga wartości od 30 do 40 razy wyższe od lepkości wody (Driouch *et al.*, 2012).

Omawiając efekty zastosowania MPEC, trzeba podkreślić, że nadrzędnym celem stosowania mikrocząstek jest zwiększenie wydajności produkcji pożądaných metabolitów dzięki sterowaniu morfologią grzybni. MPEC pozwala uzyskać dość spektakularne efekty. W tabeli 5.6 efekt zastosowania MPEC wyrażono jako czynnik wzmocnienia, który informuje, ile razy wzrosło stężenie pożądanego produktu lub aktywność wydzielonego enzymu w hodowli danego mikroorganizmu strzępkowego po zastosowaniu dodatku mikrocząstek mineralnych.

Tabela 5.6. Wydajność biosyntezy metabolitów i aktywności enzymów w hodowlach typu MPEC

Mikroorganizm	Bioreaktor*, objętość robocza, tryb pracy	Mikrocząstki	Produkt metaboliczny	Czynnik wzmocnienia ^a	Literatura
<i>Caldariomyces fumago</i> DSM 1256	ShF, 100 ml	talk	chloro-peroksydaza	10	Kaup <i>et al.</i> 2008
		tlenek glinu		6	
<i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	ShF, 50 ml	talk	α -gluko-amyłaza	5,2	Driouch <i>et al.</i> , 2010a
<i>Aspergillus niger</i> SKAn1015	ShF, 50 ml		β -frukto-furanozydaza	3	
	STB, 2200 ml, BT			2	
<i>Aspergillus niger</i> SKAn1015	STB, 2200 ml, BT	talk	β -frukto-furanozydaza	1,15	Driouch <i>et al.</i> , 2010b
	STB, od 1500 ml, FB			8	
<i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	ShF, 50 ml	krzemian tytanu	α -gluko-amyłaza	10	Driouch <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus niger</i> SKAn1015		krzemian tytanu	β -frukto-furanozydaza	4	
<i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	STB, 2200 ml, BT	krzemian tytanu	α -gluko-amyłaza	7	
	STB, od 1500 ml, FB	krzemian tytanu		7,7	
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	ShF, 150 ml	talk	lowastatyna	1,6	Gonciarz i Bizukojć, 2014
<i>Mortierella isabeli</i> -na NRRL 1757	ShF, 50 ml	talk	lipidy	2,5	Gao <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus ficcum</i> NRRL 3135	ShF 100 ml	talk	fitaza	3	Coban <i>et al.</i> , 2015a
		tlenek glinu		2	
	STB, 1000 ml, BT	talk		1,88	
<i>Aspergillus ficcum</i> NRRL 3135	STB od 1000 ml, FB	talk	fitaza	1,95	Coban <i>et al.</i> , 2015b
<i>Aspergillus ficcum</i> NRRL 3135	STB 1000 ml, CONT			1,9	
<i>Trichoderma atroviridae</i> IMI 206040	ShF, 60 ml	tlenek żelaza (II, III)	6-pentylo- α -piron	2	Etschmann <i>et al.</i> , 2015
<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	ShF, 60 ml	talk	2-fenyl-etanol	1,32	
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	STB, 5400 ml, BT	talk	lowastatyna	2	Gonciarz <i>et al.</i> , 2016
	STB, od 5400 ml, FB	talk	lowastatyna	3,5	
<i>Cerrena unicolor</i> (Bull. ex Fr.) Murr strain 137	ShF, 200 ml	tlenek glinu	lakkaza	3,5	Antecka <i>et al.</i> , 2016
<i>Pleurotus sapidus</i> DSM 8266				2	
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	ShF, 100 ml	talk	kwas mlekowy	4	Coban i Demirci, 2016
		tlenek glinu		2,3	
<i>Aspergillus sojae</i> AsT1	ShF, 100 ml	tlenek glinu	β -mannanaza	1,1	Yatmaz <i>et al.</i> , 2016
		talk		1,8	

* ShF – *shake flasks* (kolby wstrząsane); STB – *stirred tank bioreactor* (bioreaktor zbiornikowy mieszadłowy), BT – *batch* (proces okresowy); FB – *fed-batch* (proces okresowy z zasilaniem); CONT – *continuous* (proces ciągły)

Źródło: opracowanie własne na podstawie wybranych danych z różnych źródeł literaturowych.

Hodowla typu MPEC okazuje się bardzo skuteczna, jeżeli chodzi o zwiększenie wydajności biosyntezy bioproduktów. Rzadko kiedy uzyskuje się mniej niż dwukrotny przyrost stężenia danego metabolitu bądź enzymu (tylko przypadki fitazy i β -mannanazy oraz 2-feniloetanolu) po zastosowaniu różnego rodzaju mikrocząstek. Rekordowe wartości czynnika wzmocnienia dla chloroperoksydazy czy α -glukoamylazy wskazują, że potencjalnie można zwiększyć wydajność takiej hodowli nawet o rząd wielkości. Bardzo optymistyczne jest to, że skuteczność MPEC jest potwierdzona nie tylko na poziomie badań mikrobiologicznych w małej laboratoryjnej skali kolb wstrząsanych, ale także w hodowlach bioreaktorowych dla α -glukoamylazy, β -fruktofuranozydazy, fitazy i lowastatyny. Czynniki wzmocnienia są zwykle nie mniejsze, a czasami nawet wyższe w skali bioreaktora w porównaniu do kolb wstrząsanych. Dotyczy to szczególnie bioreaktorów pracujących jako okresowe z zasilaniem (*fed-batch*). Wzmocnienie 3,5-krotne dla biosyntezy lowastatyny w porównaniu do 2-krotnego w bioreaktorze o działaniu okresowym, czy też 8-krotne aktywności β -fruktofuranozydazy w porównaniu do 1,15-krotnego w bioreaktorze okresowym jest dowodem na to, jak dobrym uzupełnieniem wysokowydajnego procesu okresowego z zasilaniem jest dodatek mikrocząstek. Bioreaktor okresowy z zasilaniem, szczególnie dla grzybów strzępkowych i promieniowców, jest uważany za bardziej wydajną alternatywę, jeśli nie konieczność, wobec procesów okresowych, gdyż możliwość doprowadzania substratów (szczególnie tego węglowego) bardzo znacząco zwiększa stężenie pożądanych metabolitów. Dodatek mikrocząstek jeszcze maksymalizuje ten efekt (Driouch *et al.*, 2010b, Coban *et al.*, 2015b, Gonciarz *et al.*, 2016). Udałe eksperymenty MPEC w skali bioreaktora o objętości co najmniej kilku litrów są przesłanką, że zmiana skali tego typu hodowli nie powinna stanowić dużych problemów, co może być dobrą zapowiedzią do zastosowań tej techniki w wielkoskalowych procesach przemysłowych.

Stosując mikrocząstki w hodowlach grzybów strzępkowych, należy jeszcze zwrócić uwagę na jeszcze jedno zagadnienie. Mikrocząstki mogą sprawić, że wytwarzanie jakiegoś produktu metabolicznego będzie tak wydajne, a jego stężenie tak wysokie, że może on mieć inhibicyjny wpływ na wzrost mikroorganizmu. Normalnie dość rzadko tak się dzieje w przypadku biosyntezy metabolitów pierwotnych i wtórnych w procesach tlenowych z udziałem grzybów strzępkowych w porównaniu na przykład do bakteryjnych fermentacji beztlenowych. Jednak w przypadku biosyntezy lotnych związków chemicznych na taki potencjalny efekt inhibicyjny trzeba zwrócić uwagę. Wykazano, że zarówno 2-feniloetanol, jak i 6-penylo- α -piron posiadają swoje krytyczne stężenia inhibujące wobec swoich własnych producentów wynoszące odpowiednio $2,5 \text{ g l}^{-1}$ i 400 mg l^{-1} i są to stężenia osiągalne w hodowlach typu MPEC (Etschmann *et al.*, 2015).

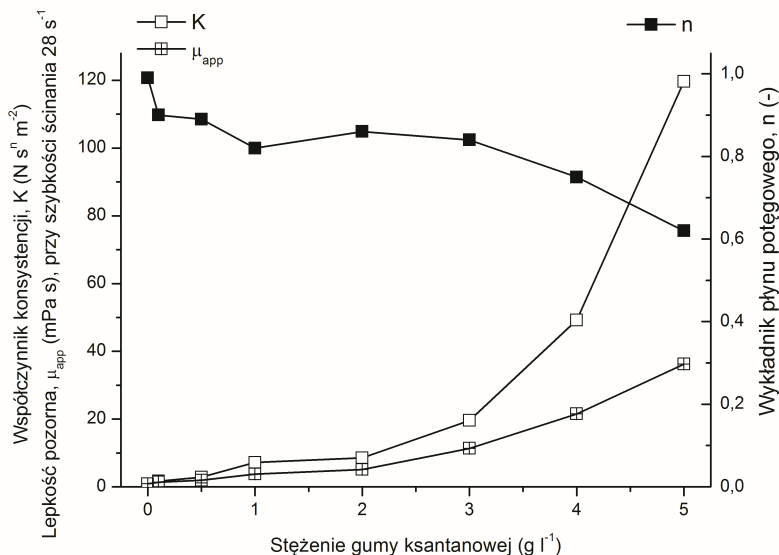
5.2.3. Inne nowoczesne techniki sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych

Zastosowanie innych nowoczesnych technik inżynierii morfologicznej do sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych jest ograniczone, a literatura przedmiotu uboga. W przypadku sterowania lepkością i napięciem powierzchniowym podłoża hodowlanych, jego osmolalnością czy nawet wprowadzaniem modyfikacji genetycznych, zaledwie od jednej do kilku oryginalnych publikacji na dany temat dokumentuje takie badania.

5.2.3.1. Dodatek substancji zmieniających lepkość i napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanych

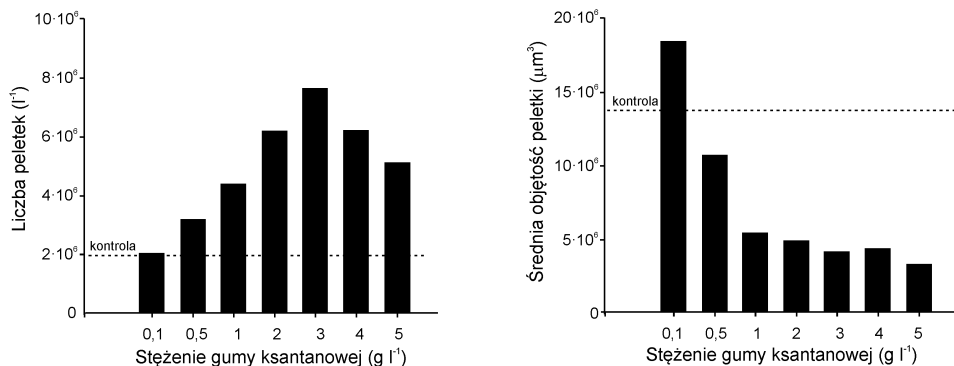
Dodatek substancji zmieniających lepkość lub napięcie powierzchniowe podłoża, w których hodowane są mikroorganizmy strzępkowe, był wcześniej niż MPEC zastosowaną nowoczesną techniką inżynierii morfologicznej, o czym była mowa w rozdziale 1.1. W dotychczasowej literaturze przedmiotu znajdują się tylko opisy jej wykorzystania wobec promieniowców przez jeden zespół badawczy. Te techniki sterowania morfologią promieniowców dość szczegółowo zbadano w hodowli wstrząsanej *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602 inokulowanej 10^{10} sporami na litr (O'Cleirigh, 2005).

Aby zmienić lepkość podłoża lub napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanego, trzeba wprowadzić do niego odpowiednią substancję. O'Cleirigh (2005) zastosował gumę ksantanową oraz niejonowe środki powierzchniowo czynne (surfaktanty). Motywacją do takich działań jest to, że lepkość i właściwości reologiczne zawiesin mikroorganizmów strzępkowych są bardzo ściśle związane z ich morfologią, co pokazano w rozdziale 4, natomiast zmiana napięcia powierzchniowego podłoża silnie oddziałuje również na właściwości powierzchniowe spor, które odpowiadają za mechanizmy ich aglomeracji. *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602, co się rzadko zdarza u promieniowców, wykazuje koagulacyjny charakter tworzenia aglomeratów i posiada dużą tendencję do tworzenia peletek (O'Cleirigh, 2005). Efekt dodatku gumy ksantanowej na zmianę lepkości i właściwości reologicznych podłoża do hodowli tego promieniowca przedstawia rys. 5.20. Zmiana lepkości podłoża wywołana gumą ksantanową spowodowała znaczące zmiany morfologiczne *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602. Przede wszystkim pojawiła się silna tendencja do zwiększenia liczby peletek na jednostkę objętości podłoża. Najwięcej ich było przy stężeniu gumy ksantanowej na poziomie 3 g l^{-1} (rys. 5.21). To stężenie gumy ksantanowej przekłada się na następujące właściwości podłoża czystego bez biomasy: pozorna lepkość równa około 10 mPa s przy szybkości ścinania 28 s^{-1} oraz umiarkowane rozrzedzane ścinaniem, z wykładnikiem płynu potęgowego na poziomie 0,8 (rys. 5.19). Pod wpływem dodatku gumy ksantanowej malała także średnia objętość peletki, chociaż przy $0,1 \text{ g l}^{-1}$ peletki były większe niż w podłożu bez dodatku tej substancji (rys. 5.20).



Rys. 5.19. Zmiany lepkości podłoża hodowlanego *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* wywołane dodatkiem gumy ksantanowej w celu sterowania formą morfologiczną promieniowca

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych tabelarycznych z: O'Cleirigh *et al.* (2005).



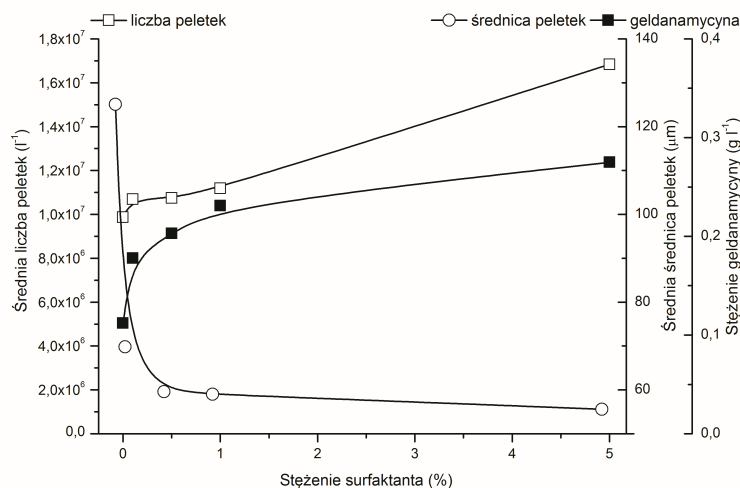
Rys. 5.20. Wpływ zmiany lepkości podłoża na morfologię promieniowca *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*

Źródło: opracowanie własne na podstawie: O'Cleirigh *et al.* (2005).

Co również istotne, zwiększenie lepkości podłoża wpłynęło na wzrost homogeniczności kultury, objawiający się węższym pikiem rozkładu normalnego wielkości peletek. Przyczyną wzrostu liczby peletek oraz takich zmian morfologicznych, jak wielkość peletek, było zmniejszenie wzajemnych oddziaływań między sporami. Lepkość podłoża ustalona w sposób sztuczny na początku

hodowli zatem może być czynnikiem sterującym rozwojem formy morfologicznej promieniowca (O'Clairigh *et al.*, 2005). Istotną obserwacją było również to, że, choć zmiana lepkości *sensu stricte* nie oddziałuje bezpośrednio na fizjologię i szlaki metaboliczne mikroorganizmu, to zdecydowanie zmienia warunki hydrodynamiczne i ruch masy w badanym układzie. Zaletą takiego układu jest obniżenie jego turbulencji przez co występują mniejsze naprężenia mechaniczne. Z drugiej strony problemem staje się zmniejszenie się objętościowego współczynnika wnikania tlenu.

W późniejszych badaniach, również w hodowli wstrząsanej, zmiany morfologii *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602 wywołano przez zmiany napięcia powierzchniowego podłoża (Dobson *et al.*, 2008). Jako czynniki obniżające napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanych zastosowane były dwa niejonowe środki powierzchniowo czynne Triton X100 oraz Tween 80. Tym razem zmiany morfologii „grzybni” zostały skorelowane z maksymalnym stężeniem geldanamycyny uzyskanym w danej hodowli. Wpływ dodatku środków obniżających napięcie powierzchniowe na liczbę peletek, ich wielkość i produkcję geldanamycyny przedstawia rys. 5.21.



Rys. 5.21. Wpływ dodatku niejonowego środka powierzchniowo czynnego na morfologię „grzybni” *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602 i wytwarzanie geldanamycyny

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych tabelarycznych z: Dobson *et al.* (2008).

Dodatek surfaktantów wywołuje zwiększenie dyspersji spor w układzie, przez co liczba utworzonych peletek rośnie, a ich wielkość maleje. Najważniejszym wnioskiem wynikającym z tych badań jest to, że mniejsze peletki skuteczniej wytwarzają antybiotyk, dlatego istnieje potrzeba wykorzystywania technik inżynierii morfologicznej wobec tego mikroorganizmu. To, że wielkość peletek *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602 wpływa na wytwarzanie

geldanamycyny, zostało dodatkowo potwierdzone poprzez zastosowanie dodatku do podłoża szklanych mikrosfer (od 0 do 55 sztuk na 100 ml) o średnicy 500 μm (technika MPEC) oraz poprzez zmianę liczby spor w inokulum od 10^5 do 10^{11} l^{-1} (tradycyjna technika inżynierii morfologicznej). Niezależnie od stosowanej techniki inżynierii morfologicznej wobec *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602, jeżeli uzyskano zmniejszenie wielkości peletek, to jednocześnie liniowo rosła wydajność biosyntezy geldanamycyny wyrażona w gramach antybiotyku na gram biomasy (jako suchej masy) od 0 do około 0,03 g geldanamycyny na gram biomasy przy zmniejszeniu wielkości peletek od 180 μm do 50 μm .

Niestety zastosowanie środków obniżających napięcie powierzchniowe, chociaż jest skuteczną techniką inżynierii morfologicznej, to jednak duże obniżenie jego wartości w napowietrzanych pęcherzykowo hodowlach bioreaktorowych niesie za sobą duże ryzyko intensywnego pienienia się brzezki.

5.2.3.2. Osmolalność podłoża a morfologia grzybni

Osmolalność roztworu definiuje się jako liczbę moli substancji osmotycznie czynnych na 1 kg rozpuszczalnika, np. wody (osmol kg^{-1}). Podobnym pojęciem jest osmolarność, ale w tym przypadku liczbę moli substancji osmotycznie czynnych odnosi się do 1 litra roztworu (osmol l^{-1}). W literaturze występują jeszcze inne określenia tej cechy roztworu, takie jak ciśnienie osmotyczne, potencjał wodny, aktywność wodna (to określenie jest najczęściej stosowane przez mikrobiologów) oraz stres solny czy osmotyczny.

Osmolalność podłoża hodowlanego zależy od wielu czynników i ma przez to wielopłaszczyznowy znaczący wpływ na wzrost grzybów strzępkowych. Na osmolalność podłoża hodowlanego wpływa przede wszystkim skład podłoża i jego zmiany związane ze zużywaniem substratów, akumulacją produktów metabolicznych oraz kontrolą pH w czasie hodowli. Takie zmiany właściwości podłoża w czasie dotyczą w szczególności hodowli okresowych w bioreaktorach. Typowe osmolalności podłoży mikrobiologicznych mieszczą się w granicach 0,28-0,32 osmol kg^{-1} . Gwałtowny wzrost osmolalności, czyli stres (szok) osmotyczny, jest często stosowanym sposobem do zwiększania wydajności wytwarzania produktów metabolizmu, a dotyczy to w szczególności białek (enzymów). W wyniku wzrostu ciśnienia osmotycznego na zewnątrz komórek następuje wzrost przepuszczalności błony komórkowej, a zatem łatwiej są wydzielane na zewnątrz białka. Przy zwiększaniu ciśnienia osmotycznego podłoża istotne jest to, jakie jony zostaną do niego wprowadzone. Dana sól musi być fizjologicznie obojętna i ten warunek spełniają przede wszystkim chlorek sodu i chlorek potasu.

W literaturze przedmiotu opisywano efekt stresu osmotycznego na wydzielanie białek enzymatycznych. Na przykład dodatek roztworu KCl do odmytej żywej grzybni *Aspergillus niger* powoduje zwiększenie wydzielania białek przez ten grzyb (Bobowicz-Lassociska i Grajek, 1995). Oksydaza glukozowa może być skuteczniej wydzielana przez *Aspergillus niger*, jeśli doda się do odmytej i odwirowanej grzybni 1,2 M NaCl. Uważa się, że zmiany potencjału osmotycz-

nego są jednym z istotnych czynników służących sterowaniu syntezą i wytwarzaniem enzymów przez mikroorganizmy (Fiedurek, 1998).

Jednakże niewiele jest danych na temat sterowania morfologią grzybni poprzez zmiany osmolalności podłoża w powiązaniu z produkcją enzymów. Na ten temat istnieje tylko jedna publikacja Wucherpenniga *et al.* (2011). Zatem poniższe rozważania są z tego względu mocno ograniczone, ale sprawą otwartą pozostają dalsze badania na ten temat.

Na początku należy sobie zadać zatem pytanie, czy zmiany osmolalności podłoża hodowlanego mogą być narzędziem inżynierii morfologicznej. Odpowiedź jest pozytywna, co zostanie tu wykazane, chociaż metoda ta nie spełnia warunku jak najmniejszego wpływu zastosowanej techniki inżynierii morfologicznej na fizjologię mikroorganizmu na poziomie szlaków metabolicznych. Zatem istotne jest odróżnienie tego, czy wpływ osmolalności podłoża na wytwarzanie enzymów wynika z oddziaływania wyłącznie na stan fizjologiczny mikroorganizmu, czy też dodatkowo na jego morfologię.

Zmienianie osmolalności podłoża hodowlanego wykorzystano do sterowania morfologią grzybni dwóch, już wcześniej omawianych w kontekście hodowli MPEC, szczepów *Aspergillus niger* SKAn1015 oraz AB1.13. Wucherpennig *et al.* (2011) badali przede wszystkim wpływ osmolalności podłoża na produkcję enzymów α -glukoamylazy i β -fruktofuranazy w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym o objętości roboczej 3 litrów.

Dla *Aspergillus niger* SKAn1015 podstawowe podłoże charakteryzowało się osmolalnością na poziomie 0,4 osmol kg^{-1} zaś badania prowadzono w zakresie 0,4-4,9 osmol kg^{-1} . Okazało się, że istnieje maksimum aktywności β -fruktofuranazy w podłożu hodowlanym (220 U ml^{-1}) między 2,6 osmol kg^{-1} a 3,2 osmol kg^{-1} . W przypadku produkcji α -glukoamylazy przez *Aspergillus niger* AB1.13 takiej zależności nie znaleziono. Aktywność enzymatyczna podłoża rosła wraz z osmolalnością od 0,2 osmol kg^{-1} (podłoże podstawowe) do 2,4 osmol kg^{-1} , osiągając wartość około 22 U ml^{-1} .

Osmolalność w znaczącym stopniu wpływa na wielkość aglomeratów grzybni. Na przykład w przypadku *Aspergillus niger* SKAn1015 średnie pole powierzchni rzutu peletki zmniejszało się z około $1,5 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$ przy 0,4 osmol kg^{-1} do poniżej $2,5 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ przy 4,2 osmol kg^{-1} . Dalsze zwiększenie zawartości soli w podłożu powodowało transformację peletek do morfologii rozproszonej. Zwiększanie ciśnienia osmotycznego podłoża wywoływało także dla tego grzyba zniekształcenie (silne wydłużenie) aglomeratów. Peletki przestawały być idealnie kuliste. Jednak w przypadku sterowania morfologią grzybni poprzez zmianę osmolalności należy wyraźnie zastrzec, że na zmiany aktywności enzymatycznej badanych grzybów *Aspergillus niger* mogły mieć wpływ nie tylko morfologia grzybni, ale także efekt fizjologiczny zwiększonego ciśnienia osmotycznego.

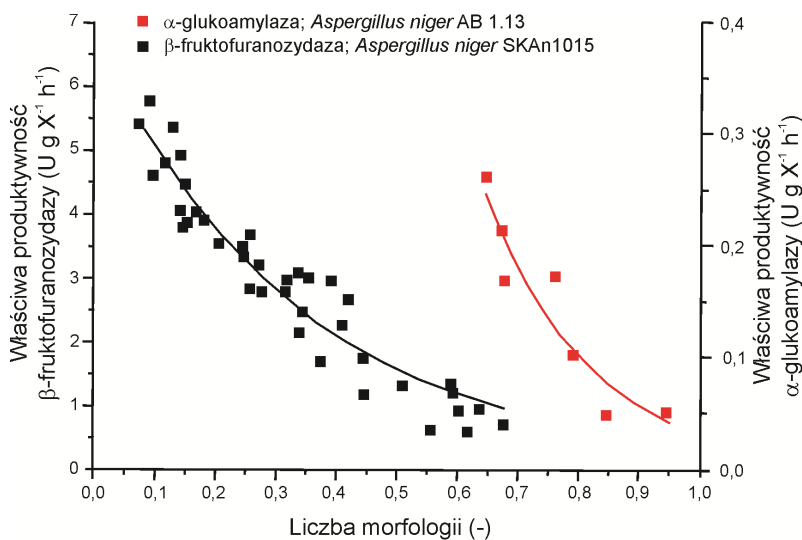
Ze względu na te silne efekty zmiany kształtu, rzadziej obserwowane np. przy MPEC, dokładne ustalenie wpływu osmolalności na makromorfologię grzybni obu szczepów *Aspergillus niger* wymagało wykorzystania cyfrowej analizy obrazu do pomiaru kilku parametrów morfologicznych aglomeratów grzybni, przede wszystkim tych, opisujących kształt obiektów. Takie parametry

stosowane w analizie obrazu mikroorganizmów strzępkowych zostały zdefiniowane w tabeli 2.1. Wucherpfennig *et al.* (2011) wykorzystali pole powierzchni rzutu, kolistość, zwartość i wydłużenie. Ponieważ analiza zmian tych wszystkich parametrów od osmolalności podłoża byłaby zbyt skomplikowana, Wucherpfennig *et al.* (2011) zaproponowali wprowadzenie oryginalnej liczby bezwymiarowej, nazwanej liczbą morfologii. Została ona zdefiniowana następująco:

$$\text{Liczba morfologii} = \frac{2 \cdot \sqrt{A} \cdot S}{\sqrt{\pi} \cdot D \cdot E} \quad (5.1)$$

gdzie: A jest polem powierzchni rzutu obiektu (*projected area*), czyli peletki (μm^2), S – zwartością obiektu (*solidity*), D – maksymalną średnicą (*maximum diameter*) peletki (μm), zaś E – wydłużeniem (*aspect ratio*).

Wartość liczby morfologii dla idealnych sferycznych i gładkich peletek wynosi 1. Fragmentom strzępek (morfologia rozproszona) odpowiada liczba morfologii równa 0. Natomiast pozostałym wartościom z tego przedziału są przypisane różne kształty i wielkości peletek. Okazało się, że istnieje wykładnicza malejąca zależność między liczbą morfologii a aktywnością enzymatyczną obu szczepów *Aspergillus niger* (rys. 5.22).



Rys. 5.22. Wpływ formy morfologicznej grzybnii *Aspergillus niger* SKAn1015 oraz *Aspergillus niger* AB1.13 wyrażonej jako liczba morfologii na aktywność β-fruktofuranazy i α-glukoamylazy

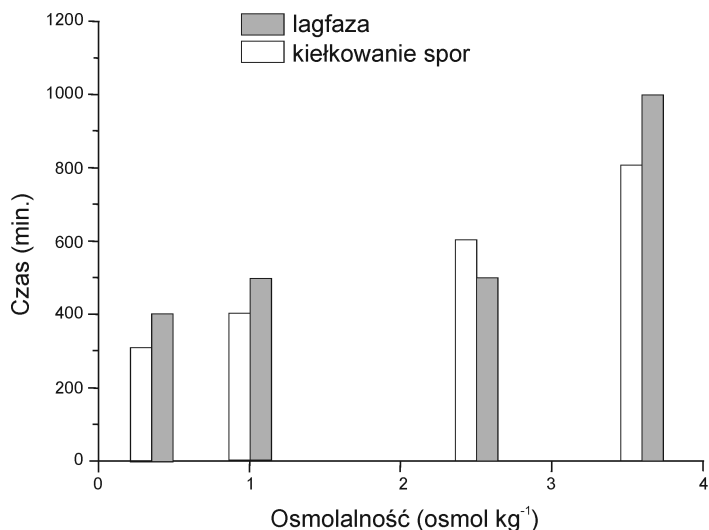
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Wucherpfennig *et al.* (2011).

W hodowlach z niską liczbą morfologii oznaczającą morfologię grzybnii bliższą morfologii rozproszonej uzyskiwano lepszą aktywność zarówno β-fruk-

tofuranozydazy, jak i α -glukoamylazy, z tym że w przypadku tego drugiego enzymu morfologia grzybni pozostawała bardziej zwarta (liczby morfologii powyżej 0,6). Mechanizm oddziaływania wzrostu osmolalności na morfologię grzybni może być związany z wpływem ciśnienia osmotycznego na proces aglomeracji konidiospor, ale wszystko, co wiemy na ten temat, jest związane z badaniami dwóch szczepów z rodzaju *Aspergillus* o koagulacyjnym mechanizmie tworzenia peletek. Warunki wzrostu obu badanych szczepów *Aspergillus niger* w bioreaktorze były takie (skład podłoża, liczba spor równa 10^9 l^{-1} , stała prędkość obrotowa mieszadła 200 min^{-1} , stała szybkość napowietrzania 1 l min^{-1} , $\text{pH} = 5$), że naturalnie mogła się wytworzyć wyłącznie grzybnia w postaci makroskopowych peletek. Jednak wzrost osmolalności do $4,5 \text{ osmol/kg}$ po dodaniu NaCl do podłoża sprawił, że powstała grzybnia rozproszona (Wucherpennig *et al.*, 2011).

To potwierdza, że poprzez osmolalność można sterować morfologią grzybni. Zaobserwowano, że oddziaływanie zwiększonego ciśnienia osmotycznego na aglomerację spor zachodzi wyłącznie w pierwszych godzinach wzrostu grzybni (do 8 godzin). Podobnie jak przy MPEC utworzone wtedy aglomeraty grzybni pozostają w przybliżeniu niezmiennie przez całą hodowlę, nawet jeśli nie są to idealne kuliste peletki, lecz pośrednie nietypowe kształty. Wucherpennig *et al.* (2011), stosując technikę dyfrakcji laserowej, dokonali pomiarów wielkości pojedynczych konidiospor i utworzonych aglomeratów bezpośrednio w bioreaktorze, używając zmian średnicy medianowej i średnicy Sautera jako mierzonych w czasie (pierwsze 30 godzin hodowli) miar wielkości obiektów zawieszonych w bioreaktorze. Jak już wspomniano w rozdziale 2.2, wczesny rozwój hodowli grzybów strzępkowych z bezpłciowych konidiospor składa się na początku z trzech etapów – pęcznienie spory, pojawienie się kielka i wydłużanie się kielka. Skokowe zmiany wartości wyżej wspomnianych mierzonych parametrów wyznaczały te istotne etapy rozwoju grzybni. Kielkowanie spor i wynikające z tego procesu wysuwanie się kielków wywoływało skokową zmianę średnicy medianowej. Natomiast średnica Sautera była wskaźnikiem tego, czy już większość spor wykiełkowała, czyli że zakończył się ten etap rozwoju grzybni. W efekcie było możliwe wyznaczenie czasu lagfazy (od wprowadzenia spor do pojawienia się pierwszych kielków) oraz czasu kiełkowania (od pojawienia się pierwszych kielków do zakończenia tego procesu). Wzrost osmolalności powodował przede wszystkim wydłużenie czasu trwania procesu kiełkowania spor. Również rozpoczęcie procesu kiełkowania spor ulegało znacznemu opóźnieniu, czyli następowało wydłużenie lagfazy (rys. 5.23).

Stosując zwiększanie osmolalności (ciśnienia osmotycznego) podłoża jako sposobu na sterowanie morfologią grzybni, trzeba jeszcze pamiętać, że pozostaje to nieobojętne wobec wzrostu grzybni. Świadczy o tym wyżej wspomniane wydłużenie lagfazy i czasu trwania kiełkowania spor oraz zmniejszenie właściwej szybkości wzrostu biomasy, które może dla *Aspergillus niger* zmaleć nawet o rząd wielkości z $0,16 \text{ h}^{-1}$ do $0,02 \text{ h}^{-1}$ przy zmianie osmolalności z $0,4$ do $4,9 \text{ osmol/kg}$ (Wucherpennig *et al.*, 2011).

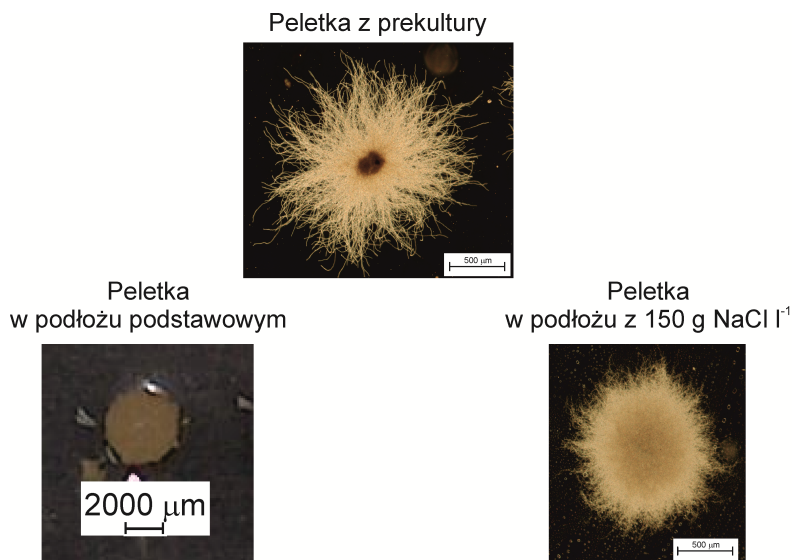


Rys. 5.23. Wpływ osmolalności na czas trwania procesu kiełkowania spor oraz lagfazy podczas wzrostu *Aspergillus niger*

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Wucherpfennig *et al.* (2011).

Efekt oddziaływania szoku osmotycznego na morfologię grzybni oraz czas rozwoju grzybni został również udokumentowany dla *Aspergillus terreus* (Boruta i Bizukojć, 2016). W tym przypadku silny szok osmotyczny (150 g NaCl l⁻¹) miał na celu nie wpływ na morfologię grzybni, ale indukcję biosyntezy metabolitów wtórnych przez ten mikroorganizm. Chociaż nie osiągnięto tego celu (nie wytworzyły się oczekiwane metabolity), to obserwacja rozwoju grzybni w czasie w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym (48 godzinne opóźnienie rozpoczęcia fazy wzrostu biomasy po inokulacji 24-godziną prekulturą bez dodatku soli zawierającą rozwinięte peletki o średnicy około 600 μm) oraz zmiany morfologiczne peletek potwierdziły efekt zwiększonego ciśnienia osmotycznego na morfologię grzybni (rys. 5.24).

W zwykłym podłożu z około 500-600 μm, nie licząc obfitego owłosienia, peletek prekultury tworzą się dość zwarte makroskopowe peletki o średnicy przekraczającej 2000 μm. Szok osmotyczny wywołał przede wszystkim zmniejszenie wielkości peletek. Ich średnica była niewiele większa od tych wprowadzonych z prekulturą. Peletki były mocno owłosione, wystające strzępki były bardzo cienkie, zaś wewnętrzna struktura peletki stała się silnie zwarta. Peletki były bardzo twarde i nie ugięły się pod naciskiem (Boruta i Bizukojć, 2016).



Rys. 5.24. Wpływ szoku osmotycznego na morfologię *Aspergillus terreus* ATCC 20542
Źródło: opracowanie własne.

Podsumowując, należy stwierdzić, że zmiana osmolalności podłoża hodowlanego jest skutecznym sposobem sterowania morfologią grzybów strzępkowych. Ze względu na silne oddziaływanie ciśnienia osmotycznego na metabolizm mikroorganizmów jej zastosowanie wydaje się być bardziej ograniczone w porównaniu do MPEC, chociaż brakuje na to bezpośrednich dowodów. Brakuje także danych eksperymentalnych dla innych grzybów strzępkowych wytwarzających inne metabolity.

5.2.3.3. Sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych przez modyfikacje genetyczne

Sterowanie formą morfologiczną mikroorganizmów strzępkowych przez modyfikacje genetyczne było historycznie pierwszą koncepcją inżynierii morfologicznej, a definicja podana w publikacji McIntyre'a *et al.* (2001) odnosiła się do tejże koncepcji. Jednak później okazało się, że ta technika inżynierii morfologicznej jest dość skomplikowana i przez to nieczęsto stosowana. Istnieją jednak w literaturze przedmiotu trzy przykłady wykorzystania tej techniki: jeden dla promieniowca i dwa dla grzybów strzępkowych.

Chronologicznie wcześniejsze były badania nad grzybem strzępkowym (Müller *et al.*, 2002a). Badania te były jeszcze określone mianem inżynierii metabolicznej morfologii (*metabolic engineering of morphology*), ale w całości pasowały do klasycznej definicji inżynierii morfologicznej. Obiektem badań był dziki szczep *Aspergillus oryzae* A1560 (poprzednio IFO 4177), będący producentem α -glukoamylazy, oraz jego mutanty z uszkodzonymi genami syntaz chitynowych – *chsB* oznaczony jako *Aspergillus oryzae* ChsB/G oraz *csmA* (syntaza chitynowa i miozynowa) oznaczony jako *Aspergillus oryzae* CM101.

Syntaza chitynowa (EC 2.4.1.16) jest enzymem katalizującym reakcję tworzenia wiązań 1,4- β -glikozydowych między resztami N-acetyloglukozaminy w celu utworzenia nierozgałęzionego polisacharydu, chityny, który jest podstawowym składnikiem strukturalnym ścian komórkowych grzybów strzępkowych. Istnieje rodzina genów *chs*, do której należą *chsA*, *chsB*, *chsC*, *chsD* oraz *csmA*, a ich uszkodzenia powodują między innymi takie efekty fizjologiczne i morfologiczne u *Aspergillus nidulans*, jak zakłócenie tworzenia konidiów, zmiany morfologii konidioforów, czy zwiększenie liczby tworzonych rozgałęzień. Uszkodzenie genu *csmA* obniża zawartość chityny, zakłóca tworzenie sept, wierzchołków i ścian komórkowych (Müller *et al.*, 2002b).

Podstawowy szczep *Aspergillus oryzae* A1560 podczas wzrostu w hodowli okresowej w bioreaktorze tworzy dużo form typu *clump* o rozmiarach od 40 μm do 150 μm już na początku hodowli, które w późniejszych godzinach hodowli mają nadal tendencję do wzrostu. Te aglomeraty zostały, może nieco na wyrost, określone przez autorów jako makroskopowe (makromorfologia), ale ich wielkość już powodowała limitację procesu dostępnością tlenu ze względu na opory dyfuzji występujące wewnątrz nich oraz zwiększanie lepkości podłoża hodowlanego (Müller *et al.*, 2002a).

Ponieważ różnicowanie się strzępek i ich parametry mikromorfologiczne, jak długość, długość HGU, średnica i stopień rozgałęziania, mają wpływ na późniejsze formowanie się aglomeratów, istotne jest to, w jakim stopniu zmiany genetyczne je zmieniają. Uszkodzenie genu *chsB* powodowało zmniejszenie się długości HGU o 52% z 97 μm wierzchołek⁻¹ do 51 μm wierzchołek⁻¹, co jest dowodem na tworzenie się bardziej rozgałęzionej grzybni. Dodatkowo średnica strzępek rosła pod wpływem uszkodzenia genu syntazy chitynowej *chsB*. W przypadku uszkodzenia genu *csmA* efektu na długość HGU nie obserwowano, natomiast tworzyło się mniej rozgałęzień. Znacząca różnica między szczepem podstawowym i mutantami występowała wtedy, gdy uwzględniono liczbę rozgałęzień w poszczególnych przedziałach grzybni: wierzchołkowym i podwierzchołkowym. Uszkodzenie genu *chsB* powodowało pięciokrotny wzrost liczby rozgałęzień w obszarze wierzchołkowym i ponad dziesięciokrotny w obszarze podwierzchołkowym. Natomiast uszkodzenie genu *csmA* tylko zwiększało liczbę tworzonych rozgałęzień w obszarze podwierzchołkowym (tabela 5.7).

Tabela 5.7. Wpływ uszkodzenia genów *chsB* i *csmA* na morfologię grzybni *Aspergillus oryzae*

Uszkodzony gen	μ_{max} (h ⁻¹)	Aktywność α -glukoamylazy (FAU g sm ⁻¹) ^a		Długość HGU (μm wierzchołek ⁻¹)	Średnica strzępki (μm)	Liczba rozgałęzień na przedział:	
		w fazie wykładniczej	na koniec procesu			wierzchołkowy	podwierzchołkowy
-	0,23 \pm 0,03	18 \pm 4	31 \pm 6	97 \pm 7	3,32 \pm 0,05	0,26	0,06
<i>chsB</i>	0,22 \pm 0,02	14 \pm 4	38 \pm 6	51 \pm 3	3,60 \pm 0,09	1,40	0,79
<i>csmA</i>	0,19 \pm 0,02	16 \pm 4	40 \pm 7	102 \pm 7	3,68 \pm 0,12	0,15	0,27

^a FAU odpowiada ilości α -glukoamylazy, która w 37°C hydrolizuje 5,26 g skrobi na godzinę

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Müller *et al.* (2002a).

Najważniejszym efektem uszkodzenia genu *chsB* było to, że bardziej rozgałęzione strzępki miały obniżoną tendencję do tworzenia form typu *clump*, co w okresowych hodowlach bioreaktorowych zdecydowanie poprawiało warunki transportu tlenu i obniżało lepkość hodowli. Mutanty rosły tylko niewiele wolniej, natomiast zwiększała się aktywność α -glukoamylazy (Müller *et al.*, 2002a).

Aspergillus glaucus CCTCC M 206022 (producent aspergiolidu A) jest kolejnym przykładem, jak można poprzez modyfikacje genetyczne wpłynąć na morfologię grzybni. Celem modyfikacji genetycznej polegającej na delecji genów odpowiedzialnych za spolaryzowany wzrost grzybni *AgKipA* oraz *AgteaA* było zwiększenie odporności grzybni na naprężenia ścinające oraz, co oczywiste, zwiększenie wydajności biosyntezy produktu. W efekcie modyfikacji genetycznych okazało się, że mutant Δ *AgKipA* w hodowli wstrząsanej tworzył bardziej zwarte peletki w porównaniu do szczepu dzikiego (morfologia rozproszona) oraz mutantu Δ *AgteaA*, który zaczął na odwrót tworzyć luźniejsze peletki owłosione. Test wytrzymałości peletek polegający na dodaniu do hodowli różnej liczby (kilku) szklanych kul o średnicy 5 mm w celu wytworzenia naprężeń ścinających w hodowli wstrząsanej jednak wykazał, że peletki wszystkich badanych szczepów ulegały destrukcji. Również w hodowlach bioreaktorowych peletki ulegały destrukcji pod wpływem naprężeń mechanicznych, ale ostatecznie, mimo, że cel większej wytrzymałości peletek nie został osiągnięty, wyżej wymienione mutanty wytwarzały aspergiolid A szybciej (o około 12-24 godzin wcześniej pojawiała się maksimum stężenia aspergiolidu) i wydajniej o 82,8%. Co więcej lepkość podłoża przy hodowli szczepu Δ *AgteaA* w bioreaktorze była niższa, co ułatwiała napowietrzanie hodowli (Cai *et al.*, 2014).

W przypadku promieniowców zastosowanie techniki inżynierii morfologicznej polegającej na zmianach genetycznych mikroorganizmu jest również możliwe, ale ze względu na prokariotyczną budowę ściany komórkowej (faktycznie jest to bakteria) nie ma ten organizm takich genów syntaz chitynowych jak grzyby strzępkowe. Stąd trudniej jest znaleźć odpowiedni gen, który miałby tak znaczący wpływ na morfologię grzybni. Istnieje jednak pewien gen, zwany morfogenem (*morphogene*) o oznaczeniu *SsgA*. Należy do rodziny genów specyficznych dla promieniowców i jest on funkcjonalnie powiązany z podziałami komórkowymi i morfogenezą. Ten gen odpowiada prawdopodobnie za sterowanie wytwarzaniem peptydoglikanu, będącego podstawowym składnikiem ścian komórkowych gramodatnich bakterii, do których należą promieniowce (Noens *et al.*, 2005). Udowodnione zostało, że wzmocnienie ekspresji genu *SsgA* przyspiesza wzrost i zmienia morfologię co najmniej kilku gatunków promieniowców z rodzaju *Streptomyces*: *Streptomyces lividans* 1326, *Streptomyces coelicolor* A3(2)M145, *Streptomyces limosus* ATCC 19778, *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, *Streptomyces roseosporus* ATCC 31568 i *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439 (van Wezel *et al.*, 2006). Wymienione wyżej promieniowce są ważnymi, także przemysłowymi, szczepami o zdolnościach do biosyntezy antybiotyków i enzymów.

Wzmocnienie ekspresji genu *SsgA* powodowało zmiany morfologiczne u wyżej wymienionych gatunków promieniowców, jednakże nie było to zawsze przejście od formy makropeletek do mniejszych peletek czy morfologii rozproszonej. Często też obserwowano zwiększenie szybkości wzrostu biomasy oraz

wydajności wytwarzania metabolitów. Przede wszystkim jednak zmiany morfologii były silnie zależne od gatunku promieniowca. Wszystkie opisane efekty wzmocnienia ekspresji genu *SsgA* dla różnych gatunków *Streptomyces* sp. zostały szczegółowo opisane w tabeli 5.8.

Podsumowując, zmiany genetyczne wydają się być dobrym narzędziem do sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych, jednakże stosunkowo rzadko stosowanym ze względu na trudności techniczne. Mówiąc o modyfikacjach genetycznych jako narzędziu inżynierii morfologicznej, należy jeszcze o jednym pamiętać. W tym podrozdziale modyfikacje genetyczne były opisywane wyłącznie jako sposób sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych. Jednak kiedy stosuje się metody inżynierii genetycznej, czy nawet fizykochemiczne metody mutacji szczepów mikroorganizmów strzępkowych w celu maksymalizacji wytwarzania produktu metabolicznego, istnieje zawsze szansa, że wytworzony wysokowydajny mutant grzyba strzępkowego czy promieniowca będzie miał inną morfologię niż szczep dziki, z którego powstał. Jednak ta zmiana morfologii wtedy nie jest celem modyfikacji genetycznej, a pojawia się niejako przy okazji. Nie jest wykluczone, że właśnie może być ona korzystna dla produktywności nowego szczepu. Ale takie przykłady nie były omawiane w tym podrozdziale, bo jako takie nie spełniają definicji inżynierii morfologicznej, której celem jest sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych.

Tabela 5.8. Wpływ wzmocnienia ekspresji genu *SsgA* na morfologię, wzrost i wytwarzanie metabolitów przez różne gatunki promieniowców

Promieniowiec	Właściwa szybkość wzrostu biomasy	Forma morfologiczna	Forma morfologiczna po wzmocnieniu ekspresji genu <i>SsgA</i>	Produkt metaboliczny	Efekt wzmocnienia ekspresji genu <i>SsgA</i>
<i>Streptomyces coelicolor</i>	przyrost z 0.14 do 0.20 h ⁻¹ ; skrócenie fazy wzrostu z 12 do 7 h	peletki	rozproszona większa liczba sept	aktynorodyna	bez zmian, ale szybsze zużywanie substratu
				undecyloprodigiozyna	10-krotny przyrost
<i>Streptomyces lividans</i>	przyrost z 0.20 do 0.29 h ⁻¹	peletki	rozproszona	melanina	przyrost produkcji
				tyrozynaza	1,7-krotny przyrost aktywności i 2,5-krotny produktywności enzymu
<i>Streptomyces limosus</i>	bd.	rozproszona	peletki	amylazy	bd.
<i>Streptomyces rimosus</i>	bd.	rozproszona silnie rozgałęziona	brak efektu	oksytetracyklina	bd.
<i>Streptomyces roseosporus</i>	przyrost	peletki	rozproszona	daptomycyna	bd.
<i>Streptomyces venezuelae</i>	bd.	rozproszona silnie rozgałęziona, sporulacja w hodowli wglębnej	brak efektu, ale hamowanie sporulacji	chloramfenikol	bd.

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z: van Wezel et al. (2006).

6. Perspektywy rozwoju inżynierii morfologicznej

Mikroorganizmy strzępkowe należą do jednych z najważniejszych mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym, bez których nie byłoby możliwości wytwarzania szeregu ważnych dla życia człowieka substancji chemicznych. Promieniowce są najważniejszymi producentami szerokiej gamy antybiotyków, zaś grzyby strzępkowe to producenci kwasów organicznych, także antybiotyków i innych substancji leczniczych oraz enzymów, w tym szeregu ważnych enzymów hydrolitycznych.

Złożona morfologia mikroorganizmów strzępkowych tworząca się podczas ich wzrostu w hodowlach wglębnych: od form rozproszonych do zwartych aglomeratów, zwanych peletkami, jest uznawana za duże utrudnienie w prowadzeniu hodowli wglębnych w bioreaktorach (Walisko *et al.*, 2015). Do głównych problemów związanych właśnie ze zmienną i złożoną morfologią tych mikroorganizmów należą: (1) niewielka szybkość wzrostu biomasy, wysoka lepkość zawiesin mikroorganizmów strzępkowych oraz ich nieniuutonowskie właściwości, (2) znaczące opory ruchu masy w tworzących się aglomeratach komórek, (3) duże wymagania procesu mieszania i związana z tym konieczność stosowania wysokich prędkości obrotowych mieszadeł (wysokie zużycie energii), co z drugiej strony powoduje destrukcję strzępek oraz (4) utrudniony i złożony proces odzysku produktów metabolicznych (Walisko *et al.*, 2012).

Jednocześnie właśnie forma morfologiczna mikroorganizmów strzępkowych ma kluczowe znaczenie w biosyntezie metabolitów pierwotnych, wtórnych oraz enzymów. Morfologia tych mikroorganizmów jest często wąskim gardłem w wielu procesach przemysłowych i dlatego niezbędne jest poznanie dokładnych zależności między nią a parametrami procesowymi. Stąd narodziła się potrzeba sterowania tym złożonym procesem tworzenia form morfologicznych, które to sterowanie nazwano inżynierią morfologiczną (Walisko *et al.*, 2015).

Chociaż nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej stosowane są zaledwie od ponad dekady, udowodniły one, a szczególnie hodowla z mikrocząstkami, że są skutecznym, wygodnym i przede wszystkim dość tanim sposobem sterowania morfologią grzybni. W konsekwencji prowadzą one do najważniejszego, czyli do zwiększenia wydajności wytwarzania produktów metabolicznych przez mikroorganizmy strzępkowe.

Inżynieria morfologiczna jest bardzo rozwojowym obszarem inżynierii biochemicznej, szczególnie że dotychczas brakuje szczegółowych ilościowych badań mechanizmu oddziaływania mikrocząstek, wysokiego stężenia jonów, zmian lepkości podłoża na proces tworzenia się aglomeratów grzybni. Otwiera to przestrzeń do rozwijania badań podstawowych.

Od strony aplikacyjnej konieczne są poszukiwania i testowania nowych tanich, skutecznych i przede wszystkim w pełni inertnych mikrocząstek, jak np. szklane kulki. Istotne jest też rozważenie recyklingu tychże mikrocząstek. W tym przypadku idealne byłyby mikrocząstki o właściwościach ferromagnetycznych. Kuszące również byłoby projektowanie mikrocząstek o idealnym, zaprogramowanym kształcie i wielkości oraz o ściśle określonych właściwościach powierzchniowych, np. mniej lub bardziej hydrofobowych lub hydro-

filowych. Pozwoliłoby to zarówno na skuteczniejsze sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych, jak i pomogło w wyjaśnieniu mechanizmów aglomeracji spor w warunkach hodowli z mikrocząstkami.

Kolejnym niezbadanym obszarem inżynierii morfologicznej jest określenie tego, w jakim stopniu stosowanie jej nowoczesnych technik oddziałuje na mikroorganizm na poziomie molekularnym. Stąd niezbędna jest analiza proteomu, transkryptomu i metabolomu mikroorganizmów strzępkowych, wobec których stosowane są te techniki. Takie działania mają zarówno charakter poznawczy, jak i aplikacyjny, gdyż być może pod wpływem mikrocząsteczek lub szoku osmotycznego pojawiają się i zostaną odkryte nowe nieznane metabolity o ważnych dla człowieka właściwościach.

Badania genetyczne mechanizmów rządzących tworzeniem takich, a nie innych form morfologicznych przez mikroorganizmy strzępkowe to kolejny otwarty rozdział badań podstawowych istotnych dla rozwoju inżynierii morfologicznej. Ideałem byłby mikroorganizm o dokładnie zaprogramowanej genetycznej morfologii, hodowany z lub bez wspomagania mikrocząstkami czy szokiem osmotycznym. W epoce szybkiego rozwoju biologii syntetycznej taki cel wydaje się być osiągalny. Pozwoliłoby to na rozwinięcie biotechnologii mikroorganizmów strzępkowych i promieniowców nowej generacji, w której problemy ich hodowli wymienione na początku tego podsumowania zostają co najmniej zminimalizowane, jeśli nie usunięte.

Literatura

1. **Amanullah A., Christensen L.H., Hansen K., Nienow A.W., Thomas C.R.** (2002) Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 77, 815-826.
2. **Angert E.R.** (2005) Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 3, 214-224.
3. **Antecka A., Blatkiewicz M., Bizukojć M., Ledakowicz S.** (2016) Morphology engineering of basidiomycetes for improved laccase biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 38, 667-672.
4. **Aris R.** (1965) A normalization for the Thiele modulus. *Ind. Eng. Chem. Fund.* 4, 227-239.
5. **Bartnicki-Garcia S.** (1973) Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 23, 245-267.
6. **Bartnicki-Garcia S.** (1990) Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis, [w:] **Heath I.B.** (ed.) *Tip Growth in Plant and Fungal Cells.* Academic Press. San Diego, California, USA.
7. **Belmar-Beiny M.T., Thomas C.R.** (1999) Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 456-462.
8. **Berkman-Dik T., Özilgen M., Bozoglu T.F.** (1992) Salt, EDTA and pH effects on rheological behaviour of mold suspension. *Enz. Microb. Technol.* 14, 944-948.
9. **Berovič M., Cimerman A., Steiner W., Koloini T.** (1991) Submerged citric acid fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 579-581.
10. **Bischoff K.B.** (1965) Effectiveness factors for general reaction rate forms. *AIChE J.* 11, 351-355.
11. **Bizukojć M., Gonciarz J.** (2015) Influence of oxygen on lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 quantitatively studied on the level of individual pellets. *Bioproc. Biosys. Eng.* 38, 1251-1266.
12. **Bizukojć M., Ledakowicz S.** (2003) Morphologically structured model for growth and citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Enz. Microb. Technol.*, 32, 268-281.
13. **Bizukojć M., Ledakowicz S.** (2005) Wpływ czynników środowiska na wzrost grzybnii oraz biosyntezę lowastatyny przez *Aspergillus terreus*. *Biotechnologia – monografie*, 2(2) 25-36.
14. **Bizukojć M., Ledakowicz S.** (2006) A kinetic model to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture. *Proc. Biochem.*, 41, 1063-1071.
15. **Bizukojć M., Ledakowicz S.** (2008) Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by *Aspergillus terreus* in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, 42, 198-207.
16. **Bizukojć M., Ledakowicz S.** (2010) The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 41-54.
17. **Bizukojć M., Pecyna M.** (2011) Lovastatin and (+)-geodin formation by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in a batch culture with the simultaneous use of lactose and glycerol as carbon sources. *Eng. Life Sci.* 11, 272-282.

18. **Bizukojć M., Pawlak M., Boruta T., Gonciarz J.** (2012) Effect of pH on biosynthesis of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnol.* 162 (2), 253-261.
19. **Bobowicz-Lassociska T., Grajek W.** (1995) Changes in protein secretion of *Aspergillus niger* caused by the reduction of the water activity by potassium chloride *Acta Biotechnologica* 15, 277-287.
20. **Boruta T., Bizukojć M.** (2016) Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 3009-3022.
21. **Braun S., Vecht-Lifshitz S.** (1991) Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology* 9, 63-68.
22. **Cai M., Zhang Y., Hu W., Shen W., Yu Z., Zhou W., Jiang T., Zhou X., Zhang Y.** (2014) Genetically shaping morphology of the filamentous fungus *Aspergillus glaucus* for production of antitumor polyketide aspergiolide A. *Microbial Cell Factories* 13:73.
23. **Calam C.T.** (1987) *Process Development in Antibiotic Fermentations*. Cambridge University Press, Cambridge UK.
24. **Caldwell I.Y., Trinci A.P.J.** (1973) The growth unit of the mould *Geotrichum candidum*. *Arch. Mikrobiol.* 88, 1-10.
25. **Carlsen M., Spohr A.B., Nielsen J., Villadsen J.** (1996) Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 266-276.
26. **Carmichael R.D., Pickard M.A.** (1989) Continuous and batch production of chloroperoxidase by mycelial pellets of *Caldariomyces fumago* in an airlift fermentor. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 17-20.
27. **Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y.** (2005) Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* 116, 61-77.
28. **Casselton L., Zolan M.** (2002) The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Rev. Genet.* 3: 683-697.
29. **Chen H.-C., Liu T.-M.** (1997) Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enz. Microb. Technol.* 21, 137-142.
30. **Chmiel A.** (1998) *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. PWN, Warszawa.
31. **Coban H.B., Demirci A., Turhan I.** (2015a) Microparticle-enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production and evaluation of fungal morphology in submerged fermentation. *Bioproc. Biosys. Eng.* 38, 1075-1080.
32. **Coban H.B., Demirci A., Turhan I.** (2015b) Enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production in fed-batch and continuous fermentations in the presence of talcum microparticles. *Bioproc. Biosys. Eng.* 38, 1431-1436.
33. **Coban H.B., Demirci A.** (2016) Enhancement and modeling of microparticle-added *Rhizopus oryzae* lactic acid production. *Bioproc. Biosys. Eng.* 39, 323-330.
34. **Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M., Luyben K.C.A.M.** (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 715-726.
35. **Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M., Luyben K.C.A.M.** (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 409-419.
36. **Deindoerfer F.H., Gaden E.L.** (1955) Effects of liquid physical properties on oxygen transfer in penicillin fermentation *Appl. Microbiol.* 3, 253-257.

37. **Deindoerfer F.H., West J.M.** (1960) Rheological examination of some fermentation broths. *J. Biochem. Microbiol. Technol* 2, 165-175.
38. **Dobson L.F., O'Cleirigh C.C., O'Shea D.G.** (2008) The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 859-866.
39. **Doran P.M.** (2004) *Bioprocess engineering principles*. Elsevier, London, UK.
40. **Driouch H., Roth A., Dersch P., Wittmann C.** (2011) Filamentous fungi in good shape: microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioengineered Bugs* 2, 100-104.
41. **Driouch H., Hänsch R., Wucherpennig T., Krull R., Wittmann C.** (2012) Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 462-471.
42. **Driouch H., Roth A., Dersch P., Wittmann C.** (2010b) Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 2011-2024.
43. **Driouch H., Sommer B., Wittmann C.** (2010a) Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 1058-1068.
44. **El-Enshasy H., Hellmuth K., Rinas U.** (1999) Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81, 1-11.
45. **Elmayergi H., Scharer J.M., Moo-Young M.** (1973) Effects of polymer additives on fermentation parameters in a culture of *A. niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 845-859.
46. **El-Sabbagh N., Harvey L.M., McNeil B.** (2008) Effects of dissolved carbon dioxide on growth, nutrient consumption, cephalosporin C synthesis and morphology of *Acremonium chrysogenum* in batch cultures. *Enz. Microb. Technol.* 42, 315-324.
47. **Etschmann M.M.W., Huth I., Walisko R., Schuster J., Krull R., Holtmann D., Wittmann C., Schrader J.** (2015) Improving 2-phenylethanol and 6-pentyl- α -pyrone production with fungi by microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *Yeast* 32, 145-157.
48. **Fiddy C., Trinci A.P.J.** (1976) Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 97, 169-184.
49. **Fiedurek J.** (1998) Effect of osmotic stress on glucose oxidase production and secretion by *Aspergillus niger*. 38, 107-112.
50. **Fletcher J.** (1969) Morphology and nuclear behaviour of germinating conidia of *Penicillium griseofulvum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 53, 425-432.
51. **Galbraith J.C., Smith J.E.** (1969) Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *Microbiology*, 59, 31-45.
52. **Gao D., Zeng J., Yu X., Dong T., Chen S.** (2014) Improved lipid accumulation by morphology engineering of oleaginous fungus *Mortierella isabellina*. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1758-1766.
53. **Gonciarz J., Bizukojć M.** (2014) Adding talc microparticles to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. *Eng. Life Sci.* 14, 190-200.
54. **Gonciarz J., Kowalska A., Bizukojć M.** (2016) Application of microparticle-enhanced cultivation to increase the access of oxygen to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mycelium and intensify lovastatin biosynthesis in batch and continuous fed-batch stirred tank bioreactors. *Biochem. Eng J.* 109, 178-188.

55. **Gonciarz J., Pawlak M., Bizukojć M.** (2012) Wymuszanie zmian formy morfologicznej grzybni *Aspergillus terreus* poprzez dodatek nieorganicznych mikrocząstek. Inż. Ap. Chem., 51(4) 123-124.
56. **Gordon C.L., Archer D.B., Jeenes D.J., Doonan J.H., Wells B., Trinci A.P.J., Robson G.D.** (2000) A glucoamylase: GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. J. Microbiol. Meth. 42, 39-48.
57. **Grimm L.H., Kelly S., Hengstler J., Göbel A., Krull R., Hempel D.C.** (2004) Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. Biotechnol. Bioeng. 87, 213-218.
58. **Grimm L.H., Kelly S., Völckerding I.I., Krull R., Hempel D.C.** (2005) Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. Biotechnol. Bioeng. 92, 879-888.
59. **Hille A., Neu T.R., Hempel D.C., Horn H.** (2009) Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. Biotechnol. Bioeng. 103, 1202-1213.
60. **Holland F.A., Chapman F.S.** (1966) Liquid mixing and processing in stirred tanks. Reinhold, New York, USA.
61. **Hughmark G.A.** (1980) Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 19, 638-641.
62. **Jonsbu E., McIntyre M., Nielsen J.** (2002) The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. J. Biotechnol. 95, 133-144.
63. **Ju L.-K., Ho C.-S., Shanahan J.F.** (1991) Effects of carbon dioxide on the rheological behaviour and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. Biotechnol. Bioeng. 38, 1223-1232.
64. **Karel S.F., Libicki S.B., Robertson C.R.** (1985) The immobilization of whole cells: engineering principles. Chem. Eng. Sci., 40, 1321-1354.
65. **Kaup B.A., Ehrich K., Pescheck M., Schrader J.** (2008) Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. Biotechnol. Bioeng. 99, 491-498.
66. **Kelly S., Grimm L.H., Hengstler J., Schultheis E., Krull R., Hempel D.C.** (2004) Agitation effects on submerged growth and product formation by *Aspergillus niger*. Bioproc. Biosys. Eng. 26, 315-323.
67. **Kelly S., Grimm L.H., Jonas R., Hempel D.C., Krull R.** (2006) Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. Proc. Biochem. 41, 2113-2117.
68. **Kim J.H., Lebeault J.M., Reuss M.** (1983) Comparative study on rheological properties of mycelial broth in filamentous and pelleted forms Eur J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18, 11-16.
69. **Kornfeld J.M., Knight S.G.** (1962) Induction of xylose reductase in germinating spores of *Penicillium*. Mycologia 54, 407-414.
70. **Krull R., Wucherpennig T., Esfandabadi M.E., Walisko R., Melzer G., Hempel D.C., Kampen I., Kwade A., Wittmann C.** (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. J. Biotechnol. 163, 112-123.
71. **Kubicek C.P., Schreierl-Kunar G., Wöhrer W., Röhr M.** (1988) Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 633-637.
72. **Lai L.-S.T., Tsai T.-H., Wang T.C., Cheng T.Y.** (2005) The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. Enz. Microb. Technol. 36, 737-748.

73. **Lejeune R., Baron G.V.** (1995) Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 249-258.
74. **Li Q., Harvey L.M., McNeil B.** (2008) Oxygen enrichment effects on protein oxidation, proteolytic activity and the energy status of submerged batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D. Proc. Biochem. 43, 238-243.
75. **Liao W., Liu Y., Frear C., Chen S.** (2007) A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae*. Biores. Technol. 98, 3415-3423.
76. **Lin P.J., Scholz A., Krull R.** (2010) Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. Biochem. Eng. J. 49, 213-220.
77. **Liu Y., Liao W., Chenet S.** (2008) Study in pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. Biotechnol. Bioeng. 99, 117-128.
78. **Mainwaring D.O., Wiebe M.G., Robson G.D., Goldrick M., Jeenes D.J., Archer D.B., Trinci A.P.J.** (1999) Effect of pH on hen egg white lysosyme production and evolution of a recombinant strain of *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 75, 1-10.
79. **Makagiansar H.Y., Ayazi Shamlou P., Thomas C.R., Lilly M.D.** (1993) The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. Bioproc. Eng. 9, 83-90.
80. **McIntyre M., Müller Ch., Dynesen J., Nielsen J.** (2001) Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. Adv. Biochem. Eng. /Biotechnol. 73, 104-128.
81. **Metz B., Kossen N.W.F.** (1977) The growth of molds in the form of pellets – a literature review. Biotechnol. Bioeng. 19, 781-799.
82. **Metzner A.B., Taylor J.S.** (1960) Flow patterns in agitated vessels. AIChE J. 6, 109-114.
83. **Metzner A.B., Otto R.E.** (1957) Agitation of non-newtonian fluids. AIChE J. 3, 3-10.
84. **Mitard A., Riba J.P.** (1986) Rheological properties of *Aspergillus niger* pellet suspensions Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 245-249.
85. **Müller C., Hjort C.M., Hansen K., Nielsen J.** (2002b) Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. Microbiology, 148, 4025-4033.
86. **Müller C., McIntyre M., Hansen K., Nielsen J.** (2002a) Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1827-1836.
87. **Nielsen J.** (1992) Modelling the growth of filamentous fungi Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 46, 187-223.
88. **Nielsen J.** (1996) Modelling the morphology of filamentous microorganism. Trends Biotechnol. 14, 438-443.
89. **Nielsen J.** (1997) Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore.
90. **Nielsen J., Johansen C.L., Jacobsen M., Krabben P., Villadsen J.** (1995) Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. Biotechnol. Prog. 11, 93-98.
91. **Nielsen J., Krabben P.** (1995) Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. Biotechnol. Bioeng. 46, 588-598.
92. **Nielsen J., Villadsen J.** (1994) Bioreaction Engineering Principles. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
93. **Novak N., Gerdin S., Berovič M.** (1997) Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-batch process. Biotechnol. Lett. 19, 947-948.

94. **Nyman J., Lacintra M.G., Westman J.O., Berglin M., Lundin M., Lennartsson P.R., Taherzadeh M.J.** (2013) Pellet formation of zygomycetes and immobilization of yeast. *New Biotechnology*, 30, 516-522.
95. **O'Cleirigh C.** (2005) Quantification and regulation of pellet morphology in *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* cultures. Praca doktorska. Uniwersytet w Dublinie, Irlandia.
96. **O'Cleirigh C., Casey J.T., Walsh P.K., O'Shea D.G.** (2005) Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 305-310.
97. **Oshero N., May G.S.** (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.*, 199, 153-160.
98. **Pamboukian C.R.D., Facciotti M.C.R.** (2004) Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Proc. Biochem.* 39, 2249-2255.
99. **Papagianni M.** (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 189-259.
100. **Papagianni M.** (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.*, 25, 244-263.
101. **Papagianni M., Matthey M.** (2004) Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations. *Proc. Biochem.* 39, 1963-1970.
102. **Papagianni M., Matthey M., Kristjansen B.** (1998) Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 2, 197-205.
103. **Paul G.C., Priede M.A., Thomas C.R.** (1999) Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. *Biochem. Eng. J.* 3, 121-129.
104. **Paul G.C., Kent C.A., Thomas C.R.** (1992) Quantitative characterization of vacuolization in *Penicillium chrysogenum* using automatic image analysis. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 70C, 13-20.
105. **Paul G.C., Kent C.A., Thomas C.R.** (1993) Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 11-23.
106. **Paul G.C., Thomas C.R.** (1996) A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 558-572.
107. **Paul G.C., Thomas C.R.** (1998) Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 60, 1-59.
108. **Pirt S.J., Callow D.S.** (1959) Continuous flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature*, 184, 307-310.
109. **Queener S.W., Ellis L.F.** (1975) Differentiation of mutants of *Cephalosporium acremonium* in complex medium: the formation of unicellular arthrospores and their germination. *Can. J. Microbiol.* 21, 1981-1996.
110. **Reuss M.** (1988) Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem. Eng. Technol.* 11, 178-187.
111. **Rodriguez Porcel E.M., Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Chisti Y.** (2005) Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochem. Eng. J.* 26, 139-144.

112. **Roels J.A., van den Berg, Voncken R.M.** (1974) Rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 201-206.
113. **Rosa J.C., Baptista Neto A., Hokka C.O., Badino A.C.** (2005) Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. 27, 99-104.
114. **Schügerl K., Gerlach S.R., Siedenberg D.** (1998) Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergilli*. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 60, 195-266.
115. **Smith J.J., Lilly M.D., Fox R.I.** (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 1011-1023.
116. **Smith J.E.** (1978) Asexual sporulation in filamentous fungi, [w:] **Smith J.E., Berry D.R.** (eds.) *The filamentous fungi*, vol. 3, Edward Arnold, London.
117. **Smith M.G., Calam C.T.** (1980) Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.* 2, 261-266.
118. **Takahashi J., Yamada K.** (1959) Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture: Part II. On the two types of pellet formation in the shaking culture. *J. Agric. Chem. Soc.*, 33, 707-709
119. **Takahashi J., Yamada K., Aasai T.** (1958) Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture: Part I. The process of pellet formation of *Aspergillus niger* under the shaking culture, and the effect of the inoculum size on the shape of pellet. *J. Agric. Chem. Soc.*, 32 (1958), pp. 501-506.
120. **Tamura S., Park Y., Toriyama M., Okabe M.** (1997) Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 523-528.
121. **Thiele E.W.** (1939) Relation between catalytic activity and size of particle. *Ind. Chem. Eng.* 31, 916-920.
122. **Tišma M., Žnidaršič-Plazl P., Vasić-Rački D., Zelić B.** (2012) Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 36-46.
123. **Tough A.J., Prosser J.I.** (1996) Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in submerged batch culture. *Microbiology*, 142, 639-648.
124. **Tresner H.D., Hayes J.A., Backus E.J.** (1967) Morphology of submerged growth of *Streptomyces* as a taxonomic aid I. Morphological development of *Streptomyces aureofaciens* in agitated liquid media. *Appl. Environ. Microbiol.* 15, 1185-1191.
125. **Trinci A.P.J.** (1978) Wall and hyphal growth. *Sci. Prog., Oxf.* 65, 75-99.
126. **Trinci A.P.J., Collinge A.J.** (1975) Hyphal wall growth in *Neurospora crassa* and *Geotrichum candidum*. *Microbiology*, 91, 355-361.
127. **Tucker K.G., Thomas C.R.** (1994) Inoculum effects on fungal morphology: Shake flasks vs. agitated bioreactors. *Biotechnol. Techn.* 8, 153-156.
128. **Tucker K.G., Thomas C.R.** (1992) Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Lett.* 14, 1071-1074.
129. **Tuffile C.M., Pinho F.** (1970) Determination of oxygen transfer coefficients in viscous streptomycete fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 12, 849-871.
130. **van Suijdam J.C., Kossen N.W.F., Paul P.G.** (1980) An inoculum technique for the production of fungal pellets. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10, 211-221.
131. **van Wezel G.P., Krabben P., Traag B.A., Keijser B.J.F., Kerste R., Vijgenboom E., Heijnen J.J., Kraal B.** (2006) Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5283-5288.

132. **van't Riet K., Tramper J.** (1991) Basic Bioreactor Design. Marcel Dekker, New York.
133. **Vanhoutte B., Pons M.N., Thomas C.R., Louvel L., Vivier H.** (1995) Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. Biotechnol. Bioeng. 48, 1-11.
134. **Vecht-Lifshitz S.E., Magdassi S., Braun S.** (1990) Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. Biotechnol. Bioeng. 35, 890-896.
135. **Vecht-Lifshitz S.E., Sasson Y., Braun S.** (1992) Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. J. Appl. Microbiol. 72, 195-200.
136. **Walisko R., Krull R., Schrader J., Wittmann C.** (2012) Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production. Biotechnol. Lett. 34, 1975-1982.
137. **Walisko R., Moench-Tegeder J., Blotenberg J., Wucherpennig T., Krull R.** (2015) The taming of the shrew – controlling the morphology of filamentous eukaryotic and prokaryotic microorganisms. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 149, 1-27.
138. **Wang L., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M.** (2003) Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. J. Chem. Technol. Biotechnol. 78, 1259-1266.
139. **Weisz P.B.** (1973) Diffusion and chemical transformation: an interdisciplinary excursion. Science 179, 433-440.
140. **Wittier R., Baumgärtl H., Lübbers D.W., Schügerl K.** (1986) Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. Biotechnol. Bioeng. 28, 1024-1036.
141. **Wongwicharn A., McNeil B., Harvey L.M.** (1999) Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. Biotechnol. Bioeng. 65, 416-424.
142. **Wösten H.A.B., Moukha S.M., Sietsma J.H., Wessels J.G.H.** (1991) Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. Microbiology 137, 2017-2023.
143. **Wucherpennig T., Hestler T., Krull R.** (2011) Morphology engineering – Osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. Microbial Cell Factories 10:58.
144. **Yang Y.K., Morikawa M., Shimizu H., Shioya S., Suga K.-I., Nihira T., Yamada Y.** (1996) Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. J. Ferment. Bioeng., 81, 7-12.
145. **Yatmaz E., Karahalil E., Germec M., Ilgin M., Turhan I.** (2016) Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced β -mannanase production. Bioproc. Biosys Eng., 39, 1391-1399.
146. **Yin P., Wang Y.-H., Zhang S.-L., Chu J., Zhuang Y.-P., Chen N., Li X.-F., Wu Y.-B.** (2008) Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. J. Chin. Inst. Chem. Eng. 39, 609-615.
147. **Ynagita T.** (1957) Biochemical aspects of the germination of conidiospores of *Aspergillus niger*, Arch Mikrobiol, 26, 329-344.
148. **Zangirolami T.C., Johansen C.L., Nielsen J., Jørgensen S.B.** (1997) Simulation of penicillin production in fed-batch cultivations using a morphologically structured model. Biotechnol. Bioeng. 56, 593-604.
149. **Zhou Y., Du J., Tsao G.** (2000) Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. Appl. Biochem. Biotechnol. 84-86, 779-789.

Summary

Filamentous fungi, called moulds, and actinobacteria are the microorganisms widely used by mankind for their unique and rich metabolism, which supplies the variety of useful chemical substances being their metabolites. In the submerged bioreactor cultivations dispersed (free hyphae) and compact morphologies (mycelial agglomerates called pellets) formed by these filamentous microorganisms are usually distinguished. Their ability to produce any primary, secondary metabolites and enzymes is dependent on their morphology. Furthermore, the morphological forms of filamentous microorganisms cultivated in a bioreactor bear the certain consequences on the run of the cultivation. To them belong the aggravated stirring and aeration of the fungal suspension due to high and non-newtonian viscosities occurring mainly at dispersed morphology or limitation in the diffusive oxygen transfer into fungal macroscopic pellets. That is why, there is a need to control the morphology of filamentous microorganisms and morphological engineering is referred as tailoring morphologies for specific bioprocesses. The traditional approaches to control the morphology of filamentous microorganisms that include varying spore suspension density, changing medium composition including pH level and controlling of mechanical stress occur insufficient. Therefore, for the efficient cultivations of filamentous microorganisms modern morphological engineering techniques like microparticle-enhanced cultivation (MPEC), changing of broth osmolality and addition of highly viscous polymers and surface active agents emerged. This book is meant to focus on the issues connected with the evolution of morphology of filamentous microorganisms, their cultivation in bioreactors, including selected process issues and, above all, the up-to-date applications of morphological engineering techniques towards various filamentous microorganisms being the producers of enzymes, primary and secondary metabolites.



Dr hab. inż. Marcin Bizukojć ukończył w 1998 roku studia na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej. Na tym samym Wydziale obronił w 2002 roku pracę doktorską oraz uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk technicznych (2010). Jest specjalistą w zakresie inżynierii biochemicznej.

W swojej pracy zawodowej zajmuje się grzybami strzępkowymi. Są to zagadnienia związane z morfologią grzybní, tworzeniem metabolitów pierwotnych (kwas cytrynowy), wtórnych (lowastatyna) i enzymów (inulinazy), hodowlą grzybów strzępkowych w bioreaktorach oraz modelowaniem ich wzrostu. W 2008 roku był stypendystą DAAD i pracował przez 12 miesięcy w Technische Universität Hamburg-Harburg. Od 2002 roku pracuje w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej Politechniki Łódzkiej, od 2012 roku na stanowisku profesora nadzwyczajnego. W latach 2002-2004 pracował w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego. Jest autorem ponad 60 artykułów naukowych w tym 44 artykułów w czasopismach posiadających Impact Factor.